

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1899

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue le Jeudi 1^{er} Juin 1899, à 1 heure

Par ALBERT VAST

Né à Vitry-le-François (Marne), le 28 Octobre 1868

LICENCIÉ ÈS-SCIENCES

ANCIEN INTERNE PROVISOIRE DES HOPITAUX DE PARIS

MÉDAILLE DE BRONZE DE L'ASSISTANCE PUBLIQUE

ACTION DE LA TOLUYLÈNE-DIAMINE
SUR LES GLOBULES ROUGES
Contribution à l'Étude de l'Hématolyse

(Travail du laboratoire de Physiologie générale de la Sorbonne)

*Président : M. CH. RICHET, professeur.**Juges : MM. DEBOVE, professeur.*

MARFAN,	} agrégés.
LANGLOIS,	

PARIS

G. STEINHEIL, ÉDITEUR

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

1899

Année 1899

THÈSE

No

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue le Jeudi 1^{er} Juin 1899, à 1 heure

Par ALBERT VAST

Né à Vitry-le-François (Marne), le 28 Octobre 1868

LICENCIÉ ÈS-SCIENCES

ANCIEN INTERNE PROVISOIRE DES HOPITAUX DE PARIS

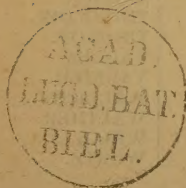
MÉDAILLE DE BRONZE DE L'ASSISTANCE PUBLIQUE

ACTION DE LA TOLUYLÈNE-DIAMINE

SUR LES GLOBULES ROUGES

Contribution à l'Étude de l'Hématolyse

(Travail du laboratoire de Physiologie générale de la Sorbonne)

*Président : M. CH. RICHET, professeur.**Juges : MM. DEBOVE, professeur.*MARFAN, }
LANGLOIS, } *agregés.*

PARIS

G. STEINHEIL, ÉDITEUR

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

1899

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

DOYEN.	M. BROUARDEL.
PROFESSEURS.	MM.
Anatomie	FARABEUF
Physiologie	CH. RICHET.
Physique médicale	GARIEL.
Chimie organique et chimie minérale	GAUTIER.
Histoire naturelle médicale	BLANCHARD.
Pathologie et thérapeutique générales	BOUCHARD.
Pathologie médicale	{ DEBOVE.
	{ HUTINEL.
Pathologie chirurgicale	LANNELONGUE
Anatomie pathologique	CORNIL.
Histologie	MATHIAS DUVAL.
Opérations et appareils	TERRIER.
Pharmacologie et matière médicale	POUCHET.
Thérapeutique	LANDOUZY.
Hygiène	PROUST.
Médecine légale	BROUARDEL.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	N...
Pathologie comparée et expérimentale	CHANTEMESSE.
	{ POTAIN.
Clinique médicale	{ JACCOUD.
	{ HAYEM.
Clinique des maladies des enfants	DIEULAFOY.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GRANCHER.
Clinique de pathologie mentale et des maladies de l'encéphale	FOURNIER.
Clinique des maladies nerveuses	JOFFROY.
	{ RAYMOND.
Clinique chirurgicale	{ DUPLAY.
	{ LE DENTU.
	{ TILLAUX.
Clinique ophtalmologique	BERGER.
Clinique des voies urinaires	PANAS.
Clinique d'accouchement	{ GUYON.
	{ PINARD.
	{ BUDIN.

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

MM.	MM.	MM.	MM.
ACHARD.	DESGREZ.	LEIARS.	THIERY.
ALBARRAN.	DUPRÉ.	LEPAGE.	THIROLOIX.
ANDRÉ.	FAURE.	MARFAN.	THOINOT.
BONNAIRE.	GAUCHER.	MAUCLAIRE.	VAQUEZ.
BROCA (AUG.).	GILLES DE LA TOURETTE.	MENETRIER.	VARNIER.
BROCA (ANDRÉ).	HARTMANN.	MERY.	WALLICH.
CHARRIN.	LANGLOIS.	ROGER.	WALTHER.
CHASSEVANT.	LAUNOIS.	SEBILEAU.	WIDAL.
PIERRE DELBET.	LEGUEU.	TEISSIER.	WURTZ.

Chef des travaux anatomiques : M. RIEFFEL.

Secrétaire de la Faculté : PUPIN.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MON GRAND-PÈRE

LE DOCTEUR VALENTIN

Chirurgien de l'Hôpital de Vitry - le - François.

A MON PÈRE

LE DOCTEUR LOUIS VAST

Ancien Interne des Hôpitaux de Paris

Membre correspondant de la Société de Chirurgie

A MA MÈRE

INTRODUCTION

L'action de la toluylène-diamine a été déjà étudiée avec soin par Stadelmann, Afanassiew, Engel et Kienner, Meunier. Ces auteurs ont fait avec cette substance un grand nombre d'expériences sur divers animaux et cherché à décrire les effets multiples qu'elle produit sur les tissus et les liquides de l'organisme. En parcourant leurs travaux, on y trouve des examens minutieux de l'urine, du sang et de la bile, des autopsies détaillées, avec examen histologique des principaux organes, des dosages du fer dans le foie, la rate, les reins et la moelle des os.

La toluylène-diamine est un poison du sang. Sous son influence les globules se décolorent, se détruisent, la matière colorante quitte le stroma globulaire sous forme de granulations que le foie transforme en bilirubine et l'ictère se manifeste. A dose plus forte, on voit se produire de l'hémoglobinhémie et de l'hémoglobinurie.

La toluylène-diamine ou crésylène-diamine a pour formule $C_7H^oAz^2 = CH_3 - C^6H^3(AzH^2)^2$. Il y en a 3 isomères, qu'on désigne généralement sous les noms de *méta*, *ortho* et *para*. Elles se dissolvent difficilement dans l'eau froide, facilement dans l'eau chaude; leur solution aqueuse se décompose rapidement et devient brune à l'air. Nous n'avons pas employé la base, mais le chlorhydrate 1. 2. 4, qui est très soluble dans l'eau froide; le groupe méthyle est en 1 et les AzH^2 en 2 et 4.

Dans une première partie, consacrée à l'historique, nous exposerons d'abord assez complètement les résul-

tats des expériences faites avec cet agent d'intoxication, puis nous analyserons rapidement les nombreux travaux parus, surtout dans ces derniers temps, sur l'isotonie et la résistance des globules sanguins et sur les méthodes propres à évaluer cette dernière.

Dans une seconde partie, nous indiquerons nos procédés d'étude, les résultats que nous avons obtenus et nous décrirons nos expériences.

Nous avons retrouvé une partie des manifestations déjà signalées avec cette substance. Il nous a semblé en outre intéressant de rechercher à nouveau, dans des expériences prolongées, le dépôt de rubigine ou pigment ocre dans le foie, la rate, le rein et la moelle des os et de doser le fer contenu dans le foie et la rate; puis d'étudier plus complètement, par la méthode de Hamburger modifiée et surtout par un procédé colorimétrique nouveau, l'altérabilité du sang après de fortes intoxications. Ce procédé colorimétrique nous semble pouvoir rendre quelques services, à côté de ceux employés jusqu'à ce jour pour évaluer la résistance globulaire. Il sera décrit en détail plus loin. Il nous a semblé, en effet, que la question de l'altérabilité et de la fragilité des globules, que le mécanisme de l'hématolyse en un mot n'avaient pas été suffisamment étudiés. Nous avons enfin constaté une altération de la matière colorante normale du globule et la présence dans le sang de la méthémoglobine, qui n'avait pas encore été signalée avec la toluyène-diamine et nous avons recherché ses relations avec la résistance globulaire.

Mais, avant d'aborder notre sujet, nous sommes heureux d'exprimer nos sentiments de reconnaissance aux maîtres qui, durant nos études, nous ont prodigué leurs savantes leçons et leurs bienveillants conseils.

Nous saluons respectueusement la mémoire de MM. les professeurs Damaschino et Verneuil et de M. le professeur agrégé Legroux.

Nous garderons toujours le meilleur souvenir de nos premiers maîtres dans les hôpitaux, de MM. les profes-

seurs Tillaux et Le Dentu, de MM. les docteurs Rigal et Ricard. Nous leur exprimons toute notre gratitude pour la bienveillance qu'ils nous ont témoignée.

Nous avons eu l'honneur d'être l'externe de M. le professeur Potain et nous n'oublierons jamais tout ce que nous devons à l'enseignement clinique de cet éminent maître.

M. le D^r Netter nous a montré l'importance de la bactériologie. Nous lui devons beaucoup de notre instruction médicale. Qu'il reçoive l'expression de notre respectueuse gratitude.

Nous avons rempli pendant une année les fonctions d'interne à l'hôpital de la porte d'Aubervilliers avec MM. les docteurs Le Gendre et Roger. Il nous a été permis d'apprécier la haute valeur de ces deux maîtres. Ils nous ont prodigué à plusieurs reprises, avec une précieuse sympathie, leurs encouragements et leurs excellents conseils. Nous tenons à les en remercier vivement.

M. le D^r Féré, l'année suivante, nous a laissé une grande initiative dans son service de Bicêtre et nous a donné de nombreuses marques d'intérêt dont nous gardons le souvenir reconnaissant.

Nous ne saurions trop remercier également MM. les docteurs Bécclère, Mathieu, Vaquez, Thiéry, Darier, L. Guinon des excellentes leçons que nous en avons reçues.

M. le professeur Richet nous fait l'honneur d'accepter la présidence de notre thèse; qu'il nous permette de lui adresser nos remerciements les plus sincères.

Enfin, c'est aussi un devoir pour nous d'exprimer notre reconnaissance à nos maîtres de la Faculté des sciences.

M. le professeur Dastre nous a accueilli dans son laboratoire merveilleusement aménagé de la Sorbonne et nous a toujours témoigné le plus bienveillant intérêt.

M. le D^r Lapicque, maître de conférences, nous a donné la première idée de ce travail; il a dirigé et suivi toutes nos recherches, contrôlé nos résultats, il ne nous a jamais ménagé ses conseils et ses encouragements.

Qu'il veuille bien agréer l'expression de notre vive et sincère gratitude.

Nous sommes aussi très heureux de pouvoir remercier M. le D^r Portier, qui, pendant ces deux années, nous a initié avec la plus extrême et amicale obligeance à la technique histologique.

HISTORIQUE

CHAPITRE I^{er}

Action de la toluylène-diamine.

Les premières expériences relatives à l'action de la toluylène-diamine furent publiées par Stadelmann en 1881 (87). Schmie-deberg, ayant produit de l'ictère chez des chiens avec cette substance, lui communiqua ses premiers résultats et l'engagea à poursuivre cet intéressant sujet. Stadelmann administrait la toluylène-diamine par la bouche, la voie sous-cutanée ou intra-veineuse. Son travail est divisé en deux parties.

Dans la première, il nous présente 18 expériences sur des chiens généralement de petite taille. Ce sont des expériences courtes, ne durant le plus souvent que quelques jours. Les doses employées sont assez variables. Avec 5 et 10 ctg. de base par kg., le chien meurt dans la nuit, à moins qu'on n'arrive que progressivement à ces doses élevées. Il se fait ainsi une sorte d'accoutumance, que nous retrouverons d'ailleurs bien nette dans nos expériences. Les doses habituelles sont de 1 ctg. 5 à 4 ctg. par kg., répétées plusieurs jours. Le chien finit par succomber, à moins qu'on ne le sacrifie par piqûre de bulbe et section des carotides.

Deux expériences consacrées à l'action de la toluylène-diamine sur le sang *in vitro* ne lui donnent pas de résultats bien nets. D'ailleurs, comme nous l'avons vu, c'est un procédé défec-tueux. Il défibrine son sang, en réserve une partie et mélange l'autre à des quantités variables de toluylène-diamine. Celle-ci, étant fortement colorée en brun, communique cette teinte au sérum, ce qui gêne l'examen spectroscopique. Après centrifuga-

tion, le sérum normal montre le spectre de l'oxyhémoglobine ; le sérum qui contient de la toluyène-diamine présente le spectre de l'hématine et, après dilution, une légère quantité d'hémoglobine. Au microscope, les globules paraissent peu modifiés.

Stadelmann fait ensuite une description méthodique des manifestations produites sur différents appareils. Elles sont plus ou moins précoces et prolongées suivant la dose employée, suivant qu'elle est unique ou renouvelée, suivant les intervalles ménagés entre les doses.

Un des premiers symptômes est la coloration ictérique des sclérotiques et des muqueuses. Elle est plus ou moins marquée, devient de jour en jour plus foncée et finit par disparaître graduellement. Les matières fécales sont colorées par la bile. L'appétit est faible ou nul, il y a souvent des vomissements alimentaires. Le chien triste, abattu, couché dans sa cage, s'affaiblit et maigrit de jour en jour, si la dose est renouvelée, sinon il se rétablit assez rapidement.

L'urine est l'objet d'un examen des plus minutieux. Au début, la réaction du violet de méthyle, qui est très sensible, donne seule des résultats, puis l'urine, devenant nettement ictérique, donne les réactions de Gmelin et d'Huppert ; la réaction de Pettenkofer y signale des acides biliaires. Elle renferme parfois un peu d'albumine, ou même du sang, que l'on reconnaît au spectre de l'oxyhémoglobine et à la présence de globules souvent modifiés. Elle contient aussi beaucoup de phosphates tribasiques, son poids spécifique est très augmenté ; quelquefois on y trouve un sédiment sans caractères morphologiques. Au bout d'un certain nombre de jours elle reprend son aspect normal.

A l'autopsie, on voit une coloration ictérique de la peau et des tissus sous-cutanés, surtout du tissu adipeux. La muqueuse et la séreuse de l'intestin sont fortement colorées par la bile, sans trace de congestion. Le contenu intestinal est très ictérique, surtout dans l'intestin grêle. La lymphe des chylifères, des lymphatiques et du canal thoracique est également colorée ; la rate est un peu hypertrophiée, les reins ne présentent pas de signe de néphrite, leur coloration est un peu jaunâtre.

Le foie est de volume normal, fortement coloré par la bile ; il ne semble pas gras et contient beaucoup de sang. Sa surface est lisse. A la coupe, on voit assez nettement les petites voies biliaires ; elles sont fortement distendues par la bile, qui s'écoule. Il n'y a pas de congestion des voies biliaires. A l'examen microscopique, les cellules sont généralement bien conservées, finement granulées, ou avec quelques granulations plus grosses cachant le plus souvent le noyau et infiltrées parfois de gouttes de graisse. On peut y voir de petits cristaux de bilirubine et du pigment jaune amorphe ; les cellules sont alors petites et un peu ratatinées. Il y a souvent plusieurs noyaux par cellule. Dans le tissu interstitiel, il y a beaucoup de cristaux de bilirubine et encore plus de masses amorphes. En dehors de cela, le tissu interstitiel est absolument normal et ne présente aucune trace d'inflammation ou de prolifération.

Le canal cholédoque est perméable. Il n'y a pas de bouchon muqueux dans les voies biliaires. L'orifice duodénal du cholédoque est très coloré. La vésicule est souvent distendue, remplie d'une bile foncée, épaisse, visqueuse. Le sang se coagule normalement ; il ne présente rien de particulier au microscope, ses globules sont un peu pâles.

Stadelmann fait ensuite quelques expériences sur des chiens porteurs de fistule biliaire. Dans de nombreux tableaux, pendant un mois, il note la quantité de bile recueillie chaque jour et à des périodes déterminées de la journée, avec son poids spécifique, et la quantité totale et proportionnelle de la bilirubine. Puis il injecte à diverses reprises de la toluylène-diamine et dans des tableaux analogues il exprime les modifications survenues.

Il cherche de même si ces résultats sont influencés par une alimentation plus ou moins substantielle et constate peu de différence. Il essaye aussi si, en faisant absorber une grande quantité d'eau par l'intermédiaire d'une sonde pharyngienne, il n'obtiendra pas une bile plus diluée et un plus faible ictère, mais cela n'empêche pas un fort ictère de se produire et l'urine de renfermer une grande quantité de bilirubine.

Dans la deuxième partie de son travail, parue quelque temps après, Stadelmann nous présente les résultats de 15 expériences.

ces sur les chats et de 12 sur les lapins. Chez les chats, la toluylène-diamine est administrée par la bouche ou par la jugulaire, mais le plus souvent sous la peau. Les doses reçues par la bouche varient de 0,20 à 0,30 centigr. ; avec 0,30 on trouve l'animal mort le lendemain. Les injections sont de 0,11 à 0,26 centigr. Il s'agit encore d'expériences courtes, le plus souvent avec une seule dose. Les animaux qui ne meurent pas sont sacrifiés pour l'examen des organes.

Sous l'influence de la toluylène-diamine, les chats ne tardent pas à être malades, se tiennent difficilement debout, mangent peu, vomissent quelquefois, ont une forte salivation, puis au bout de quelques jours, si la dose n'a pas été trop forte, le poison s'élimine et ils redeviennent éveillés, reprennent de l'appétit et ne présentent plus rien d'anormal, sauf qu'ils sont très amaigris.

L'ictère semble apparaître beaucoup plus tard aux sclérotiques chez les chats et être peu marqué, alors que l'urine est déjà ictérique depuis quelque temps et que l'animal est très malade. On voit plus généralement les sclérotiques tout à fait blanches, très anémiques, de même que les autres muqueuses. On rencontre parfois une forte diarrhée bilieuse.

Très rapidement l'urine devient foncée, puis généralement fortement sanglante, avant d'être nettement ictérique. Elle ressemble alors à une solution d'hémoglobine. Cet aspect peut se manifester surtout après dilution; il faut de même souvent diluer l'urine pour apercevoir les raies d'oxyhémoglobine au spectroscope. Avec cet instrument, on voit dans le rouge une raie très nette, qu'il dit être celle de l'hématine, avec absorption de toute la partie droite du spectre. Si l'on dilue, la raie de l'hématine pâlit ou disparaît et on ne voit que les deux bandes de l'oxyhémoglobine.

L'urine devient ensuite moins ictérique et moins chargée de sang, puis elle revient à la normale. Elle renferme un peu d'albumine parfois. Au microscope on voit beaucoup de phosphates tribasiques, des masses amorphes et des produits de déchet de formes et de grandeurs diverses qui sont des globules modifiés ayant perdu leur forme arrondie. Il y a aussi quelques rares globules peu modifiés, pâles, discoïdes. Il semble que les

produits de destruction des globules apparaissent avant les globules non altérés. Il n'y a pas de cylindres, pas de forme cristalline anormale. Le plus souvent l'urine est acide. Le poids spécifique augmente rapidement, puis diminue. On ne trouve jamais d'acides biliaires.

Le sang est rouge brun foncé. Il donne relativement peu de fibrine. Après centrifugation, le sérum est très rouge, clair, transparent ou un peu brunâtre; il contient évidemment une quantité notable d'hémoglobine en solution. Examiné au microscope, ce sérum renferme encore des globules sanguins, mais peu nombreux et n'ayant pu communiquer au sérum sa coloration rougeâtre. Il peut ne pas y avoir de globules. Au spectroscope, il donne la raie de l'hématine et un large spectre d'absorption. Après dilution, on voit les bandes de l'hémoglobine et une raie pâle et étroite d'hématine. La raie de l'hématine est entre C et D, plus près de C, à la limite du jaune et du rouge; donc il y a eu dissolution des globules rouges et formation d'hématine.

L'examen du sang frais au microscope montre des globules un peu ratatinés, souvent allongés, rarement en forme de pile de monnaie, mais en amas irréguliers de 6 ou 8. Parfois les globules présentent quelques altérations; la plupart sont petits, pâles et entourés d'un grand nombre de granulations. Le sang frais examiné au spectroscope montre la raie de l'hématine; si on le dilue un peu, on voit aussi les bandes de l'oxyhémoglobine. On ne trouve pas d'acides biliaires dans le sang.

A l'autopsie, Stadelmann fait les mêmes constatations que précédemment sur les chiens. Il ne trouve pas de dégénérescence graisseuse à proprement parler dans le foie; il y a quelques amas de graisse, mais ils existent normalement chez le chat. Dans les reins, il ne voit rien d'anormal à la coupe. Les noyaux sont presque partout nets; il n'y a pas de dépôt graisseux. Il n'y a pas de cylindres ou de globules sanguins dans les canaux urinifères, pas de trace d'une inflammation quelconque. Il y a des globules sanguins dans le tissu interstitiel, dans les glomérules et surtout à la surface de ceux-ci, à la limite de la capsule de Bowman, peut-être même dans celle-ci.

Chez les lapins, l'administration de la toluylène-diamine se

fait de la même façon, aux doses de 0,40 à 0,20, de 0,50 ou de 1 gr. On leur donne généralement une seule dose moyenne ou des doses plus faibles et répétées. Les lapins succombent parfois rapidement après une dose très forte ou lentement, de cachexie, après un grand amaigrissement, un affaiblissement des bruits du cœur et une grande anémie des muqueuses. La peau est faiblement colorée en jaune, les sclérotiques ne présentent rien d'anormal ou sont peu colorées. La réaction de Gmelin réussit rarement et faiblement dans l'urine. Elle ne renferme généralement pas de sang, sauf dans quelques cas où on a fait beaucoup d'injections, pas d'albumine non plus. Il n'y a généralement pas d'acides biliaires. Le sang est très foncé et ne présente rien d'anormal au microscope. A l'autopsie, les organes paraissent très anémiés, mais peu ictériques; dans l'intestin les matières sont colorées par la bile.

En 1883, Afanassiew (2) reprit les expériences de Stadelmann et fit paraître un important travail sur l'ictère et l'hémoglobinurie produits par la toluylène-diamine et d'autres agents destructeurs des globules du sang. Nous y trouvons 20 expériences avec la toluylène-diamine, dont 3 sur des chats, le reste sur des chiens. Ses expériences sur les chiens se répartissent en plusieurs groupes. Il recherche d'abord les symptômes décrits par Stadelmann, puis fait l'étude de la bile au moyen d'une fistule biliaire et enfin il consacre près de la moitié de ses expériences à la question de la destruction des globules sanguins.

Il administre la toluylène-diamine le plus souvent par la bouche, quelquefois par la voie sous-cutanée ou la voie veineuse. Ce sont des expériences courtes, il donne presque toujours une seule dose, exceptionnellement deux ou trois, et de 3 à 6 ctg. par kg. Ses animaux sont le plus souvent sacrifiés et il peut ainsi dans de bonnes conditions étudier les lésions histologiques des organes, les tissus prélevés quelque temps après la mort étant déjà altérés.

Il retrouve les symptômes déjà signalés, l'ictère des sclérotiques et de la peau, le mauvais état des animaux, la coloration ictérique de l'urine, avec la réaction de Gmelin et parfois de Pettenkofer, quelques traces d'albumine, mais pas d'hémoglobine.

A l'autopsie, le foie est de volume variable, ictérique, un peu gras, dur ; le parenchyme est gris jaunâtre, la veine centrale du lobule rouge noir et dilatée. Les voies biliaires sont perméables et remplies de bile qui présente les caractères déjà décrits. Dans le duodénum il y a parfois une grande quantité de bile, mais peu dans la dernière portion de l'intestin. Les lymphatiques de la veine porte sont colorés en jaune, ainsi que ceux du mésentère et les chylifères.

Les cellules hépatiques renferment des gouttelettes de graisse qui cachent en partie le noyau. Les cellules épithéliales des voies biliaires sont aussi en dégénérescence graisseuse. Sur des préparations fraîches, les capillaires biliaires autour de la veine centrale du lobule sont élargis, variqueux et remplis de bile. En poussant une injection colorée dans les capillaires biliaires, il obtient un très beau réseau polygonal. Tous les organes et tissus du corps sont fortement ictériques, ainsi que les liquides de l'organisme, par exemple le sérum sanguin. La rate est un peu augmentée de volume et presque noire.

En somme, dans ces expériences, il constate que l'ictère est déjà très manifeste après 24 heures et l'injection des capillaires biliaires tout à fait belle sur des préparations fraîches après 48 heures, alors qu'après la ligature du cholédoque seule on n'obtient qu'au bout de 4 jours seulement une faible coloration jaunâtre des sclérotiques et que l'injection des capillaires biliaires n'apparaît encore que plus tard.

Dans quelques expériences, il fait une ligature du canal cystique, met une canule dans le cholédoque et examine la sécrétion biliaire normale, puis il injecte de la toluyène-diamine et étudie les modifications de la bile. Après augmentation de l'eau et des principes solides, ceux-ci diminuent, tout en restant un peu supérieurs à la normale, alors que la quantité d'eau s'accroît encore. En résumé, il y a d'abord augmentation (1 1/2 à 2 fois) et peut-être légère concentration de la bile, puis diminution et dilution de celle-ci. La toluyène-diamine produit donc au début de la polycholie, puis il y a rétention de la bile par la présence de bouchons dans les petits capillaires biliaires, et la polycholie terminale correspond probablement à la désobstruction des voies biliaires.

Dans les expériences suivantes, il étudie particulièrement l'action de la toluylène-diamine sur les globules rouges. Il reçoit le sang dans une solution à 6 ‰ de NaCl ou fait des préparations de sang desséché, qu'il place quelques secondes dans une solution faible d'iodure de potassium ioduré, puis après séchage qu'il recouvre de glycérine gommée.

Les globules rouges sont ainsi vus presque à l'état naturel. L'iode fait distinguer la partie des globules qui est colorée par l'hémoglobine de celle qui ne l'est pas, ou des stromas incolores. Il prend le sang au cœur, dans la rate, dans les vaisseaux ou par piqûre de l'oreille.

Le sang est rouge brun, couleur chocolat. Il présente de grandes modifications, mais tout d'abord elles sont peu nombreuses. Elles sont très manifestes 24 heures après l'injection, puis diminuent. Au début, les globules se ratatinent seulement un peu plus vite, sont un peu plus pâles, la quantité des globules blancs est légèrement augmentée et le plasma renferme de petites granulations jaunâtres. Puis un peu plus tard la plupart des globules sont modifiés et de façon différente. On trouve des gouttelettes ou des granulations adhérant encore en un point des globules et prêtes à s'en détacher.

Une partie de la matière colorante s'engage parfois dans ces granulations, laissant voir une portion du stroma incolore. D'autres globules ont leur matière colorante amassée en leur milieu sous la forme d'une raie ou d'un croissant, tandis qu'une granulation est en voie de séparation. Quelques autres sont tout à fait décolorés et réduits à leur stroma, qui contient généralement de 1 à 6 granulations ou davantage réparties à la périphérie.

Parfois encore, la plus grande partie du globule étant tout à fait normale, une portion seule de la périphérie est décolorée et émet des granulations.

Enfin les hématies peuvent être tout à fait incolores, ce qu'en Allemagne on appelle des « schatten ». Suivant les cas, ces altérations sont plus ou moins marquées. Elles se manifestent plus tôt dans la rate que dans les vaisseaux sanguins.

Dans ces dernières expériences, Afanassiew constate avec des doses élevées d'abord un fort ictère et plus tard seulement

de l'hémoglobinurie. Sous l'influence de doses plus fortes encore, l'ictère et l'hémoglobinurie paraissent en même temps. Le résultat des autopsies ne présente rien de bien particulier. Il signale cependant dans la partie inférieure du cholédoque la présence d'un bouchon formé d'épithélium dégénéré. La muqueuse de ce conduit n'est pas lisse, mais présente un faible revêtement d'épithélium en dégénérescence graisseuse. Les capillaires sanguins du foie sont remplis de globules altérés et dans les espaces interlobulaires on voit de grandes quantités de leucocytes, dont quelques-uns déjà très modifiés. Les tubuli contorti et les canaux collecteurs du rein sont remplis de cylindres pigmentés.

Ainsi donc, Afanassiew a trouvé chez les chiens ce que Stadelmann avait signalé chez les chats. Il a en outre décrit les modifications du sang et la présence des produits de destruction des globules rouges dans les capillaires sanguins du foie et des reins. Il a rencontré aussi l'ictère et l'hémoglobinurie en même temps, mais il est difficile, quand l'hémoglobinurie est très forte, de constater dans l'urine la présence de la matière colorante de la bile et des acides biliaires.

Il examine ensuite les différentes hypothèses relatives à la production de l'hémoglobinurie et les rapports qui existent entre elle et l'ictère. Nous en dirons quelques mots, puisque nos recherches ont surtout porté sur le mécanisme de la destruction des globules.

D'après la 1^{re} hypothèse, les acides biliaries de l'ictère s'accumuleraient dans le sang, où ils détruiraient les globules rouges.

Dans la 2^e hypothèse, la toluyène-diamine ou ses produits d'oxydation agiraient directement sur le sang. Les globules détruits augmenteraient l'activité sécrétoire du foie et participeraient à la formation de la bile. L'absorption de la bile par le foie serait favorisée et ainsi se produirait l'ictère. Avec des doses plus fortes, la destruction globulaire s'accroîtrait, une partie serait utilisée par le foie à la formation de la bile, l'autre passerait par le rein en produisant l'hémoglobinurie. Avec des doses encore supérieures, le nombre des globules détruits serait tel que l'hémoglobinurie apparaîtrait avant l'ictère.

D'après la 3^e hypothèse, la toluylène-diamine déterminant la destruction des globules, une partie de ceux-ci sortirait par le rein en produisant l'hémoglobinurie, l'autre partie serait changée dans le sang en matière colorante de la bile et causerait l'ictère des tissus.

Pour Afanassiew cette dernière interprétation de l'hémoglobinurie est la vraie, mais il n'est pas partisan de la théorie de l'ictère hémotogène. Pour lui, l'ictère tire son origine du foie. Or, très peu de temps après l'intoxication par la toluylène-diamine, le microscope montre diverses altérations des globules, bien avant l'apparition de l'ictère. Les expériences *in vitro* avec la même substance montrent aussi la rapide destruction des globules. Donc c'est la toluylène-diamine qui détruit les globules ; ceux-ci s'accumulent d'abord dans les capillaires sanguins du foie, y activent la sécrétion hépatique et servent à la formation de la bile. La bile est augmentée, elle est absorbée par le foie et l'ictère se produit. Il disparaît dès que la destruction globulaire est terminée. Avec une dose plus forte, le foie ne peut utiliser tous les matériaux produits par la destruction des globules ; une partie va dans l'urine et remplit les canaux urinaires. Presque en même temps apparaît dans le sang de l'hémoglobine dissoute.

Afanassiew a vu chez les chats les mêmes phénomènes que chez les chiens. Cependant chez eux l'ictère des sclérotiques est peu marqué, alors que celui des tissus à l'autopsie l'est davantage. L'hémoglobinurie est toujours plus prononcée que l'ictère. Il explique ce fait par la facilité avec laquelle les chats ont de la diarrhée, qui évacue de l'organisme une grande quantité de bile. Les altérations du sang sont toujours plus intenses chez eux. Elles sont précoces et durent longtemps, ce qui explique encore la prédominance de l'hémoglobinurie et sa fréquence. Il administre à ses chats 5 ou 6 ctg. par kg. de toluylène-diamine. Dans l'urine qui est fortement hémoglobinurique, on voit toujours de l'oxyhémoglobine et quelquefois de la méthémoglobine. La réaction de Gmelin n'est jamais bien nette, toujours très faible quand elle existe ; on ne trouve jamais d'acides biliaires.

L'année suivante, en 1884, Afanassiew (3), dans une autre communication, étudie les lésions des reins et du foie dans cer-

tains empoisonnements s'accompagnant d'hémoglobinurie ou d'ictère. Après avoir expérimenté avec la glycérine et l'acide pyrogallique, il continue ses recherches sur la toluylène-diamine. Ses expériences sont au nombre de 4, suivies de mort des chiens. Les doses employées sont de 4 à 7 cgt. et même 11 cgt. par kg. ; il fait 1 à 4 injections au plus. Il constate qu'il est difficile de trouver la dose de poison suffisante pour déterminer une hémoglobinurie notable sans causer la mort.

La toluylène-diamine qu'il emploie est presque blanche et se dissout à chaud dans l'eau. Son action est différente, suivant qu'on l'administre par la bouche ou la voie sous-cutanée. Introduite dans les voies digestives, il obtient de l'ictère et à plus forte dose de l'ictère et ensuite de l'hémoglobinurie. Injectée sous la peau, elle produit de l'ictère et rarement de l'hémoglobinurie ; on en voit cependant quand on l'acidifie légèrement. Cela est dû à ce que son action est renforcée par l'acidité de l'estomac ou à ce qu'elle est plus facilement transportée de l'estomac et de l'intestin jusqu'au foie. Elle détermine des lésions très rapides du foie, dont les cellules perdent la propriété de décomposer l'hémoglobine et les autres produits dérivés du sang et de les transformer en pigments biliaires ; c'est pourquoi l'hémoglobine et ces produits de destruction traversent les reins et déterminent de l'hémoglobinurie.

Les altérations du sang sont celles qu'il a décrites précédemment. Les granulations colorées vont principalement dans le foie, la rate, la moelle des os et seulement en partie dans le rein.

L'empoisonnement chronique s'accompagne de lésions très marquées des cellules hépatiques. On observe une dégénérescence graisseuse notable, surtout au centre du lobule, où les cellules se remplissent de bilirubine et de produits de destruction des globules, puis se nécrosent. On voit une infiltration cellulaire autour de la veine centrale et dans les espaces interlobulaires. La rate hypertrophiée est rouge noir. Les reins sont bariolés avec parfois des raies allant de la périphérie au centre. Les pyramides sont hyperémies. L'épithélium glomérulaire est détruit. On voit parfois des glomérules paraissant ratatinés et une infiltration cellulaire autour de la capsule. On

trouve au milieu des canaux urinifères de petites gouttelettes de graisse et des vacuoles dans les cellules de l'épithélium. Il y a différents cylindres pigmentés à l'intérieur des tubes contournés et des tubes droits : des cylindres d'hémoglobine ou de méthémoglobine, des cylindres contenant des pigments biliaires et enfin des cylindres contenant des granulations ou des gouttelettes et formés par les produits de destruction du sang.

En 1887 paraît un nouveau travail de Stadelmann (88) sur l'empoisonnement chronique par la toluylène-diamine.

Éliminons d'abord deux expériences sur des lapins qui reçoivent 6 doses de 5 à 7 ctg. par kg. tous les deux jours et chez lesquels après la mort on ne constate pas d'ictère, mais seulement une grande anémie avec beaucoup de stromas incolores dans le sang. L'autopsie ne donne pas de résultats intéressants. Ce sont d'ailleurs de mauvais animaux d'étude. Leur foie est rarement normal.

Nous trouvons ensuite onze expériences sur des chiens, dont les unes courtes avec le plus souvent une seule dose mortelle, les autres prolongées, où il administre jusqu'à 15 doses par la bouche, séparées par quelques jours, et obtient un ictère durant jusqu'à dix semaines. Dans ces dernières expériences, les quantités de toluylène-diamine sont faibles et vont en augmentant légèrement.

Dans les expériences courtes, nous retrouvons les symptômes déjà décrits et la mort arrive parfois tellement vite qu'on ne trouve pas d'ictère. Il y a peu de modifications histologiques dans le foie et la rate. Le foie et les reins présentent de la dégénérescence graisseuse ; il y a des vacuoles dans le foie, dues probablement au départ de la graisse. Les épithéliums rénaux sont altérés, surtout ceux des tubuli contorti ; les limites des cellules ne sont pas nettes, la lumière des canaux ne se voit plus, sans qu'il y ait de cylindres ; les noyaux se colorent mal, il y a aussi beaucoup de vacuoles. En somme on rencontre les lésions habituelles des intoxications aiguës par les poisons du sang.

Les expériences qui suivent ont une durée plus longue. Les animaux sont maintenus en vie le plus longtemps possible et il s'efforce d'espacer les doses de façon que l'ictère ne disparaisse

jamais. L'ictère reste constant et modéré, bientôt l'anémie se produit et à la fin l'animal est fort amaigri.

A l'autopsie, on trouve un ictère modéré et une grande anémie de tous les organes. Le foie est dur et fragile, il ne présente pas de cirrhose microscopiquement. Sur des préparations histologiques, on voit beaucoup de pigment, le plus souvent amorphe, parfois cristallin. Ce pigment est en masses plus ou moins volumineuses ; il se colore dans sa plus grande partie, environ les deux tiers, en noir ou en vert foncé par le sulfhydrate d'ammoniaque ; une partie reste jaune et ne se colore pas, malgré une longue application de sulfhydrate. La distinction au microscope entre ces deux sortes chimiques de pigment est impossible. Ce pigment est logé en partie dans les cellules hépatiques, en partie dans le tissu conjonctif, qui est généralement peu augmenté de volume et surtout autour des vaisseaux portes et dans ces vaisseaux eux-mêmes. Dans ceux-ci on rencontre des cellules provenant des veines spléniques et chargées de pigment. Ce pigment, qui est situé surtout aux limites des lobules et dans les vaisseaux portes, provient donc de la rate. Beaucoup de cellules hépatiques qui sont remplies de pigment paraissent fortement atrophiées ; un grand nombre semblent petites, ratatinées, à limites effacées et irrégulières ; leurs noyaux, dont la forme est conservée, se colorent plus ou moins facilement ; en certains endroits elles sont absolument détruites, alors que dans d'autres elles sont bien conservées. Les altérations sont, on le voit, assez variables. La dégénérescence graisseuse est plus ou moins marquée, la graisse se montre dans les cellules à l'état de granulations ou en forme de petites ou de grosses gouttelettes.

La rate est hypertrophiée, de coloration foncée, molle. Elle renferme beaucoup de pigment ferrugineux, constitué par de petites granulations, ou le plus souvent par des blocs un peu plus gros que ceux du foie.

Ce pigment est répandu à travers tout l'organe. Les cellules de la rate sont modifiées, atrophiées et en partie détruites.

La capsule du rein s'enlève facilement. Le rein est en général très bariolé, avec des bandes jaunes et brunes à la limite de la substance corticale et de la substance médullaire, ou dans cette

dernière. Il n'y a pas de pigment ferrugineux. Les canaux urinaires contiennent quelques cristaux d'hémoglobine et beaucoup de produits de déchet jaunâtres. Les cellules épithéliales présentent une dégénérescence grasseuse plus ou moins marquée avec quelques vacuoles. Il y a une très faible augmentation du tissu conjonctif. Les épithéliums rénaux sont malades ; les cellules sont troubles, en partie ratatinées, en partie renflées, leurs limites sont disparues, leurs noyaux se colorent plus ou moins facilement. Il y a un exsudat moyen dans les capsules de Bowmann.

En résumé, dans ces expériences d'intoxication chronique par la toluylène-diamine, il y a une légère dégénérescence grasseuse du foie et du rein, ce qui n'a rien de bien étonnant dans cet état d'anémie des animaux. La légère augmentation du tissu conjonctif ne paraît pas en rapport avec l'action de la toluylène-diamine et doit exister depuis longtemps. Par contre, l'influence du toxique est très nette sur les cellules hépatiques et spléniques. On remarque une grande abondance du pigment dans le foie et la rate ; il y est quelquefois à l'état cristallin, mais le plus souvent à l'état amorphe et suivant les cas il est plus abondant dans les cellules ou dans le tissu conjonctif. Le pigment de la rate est le plus souvent en blocs volumineux. A l'inverse de celui du foie, qui ne contient du fer que dans ses 2/3 environ, il devient presque totalement noir par le sulfhydrate d'ammoniaque. Les reins sont atteints de néphrite parenchymateuse. L'augmentation du tissu conjonctif est de date plus ancienne.

Toutes les lésions organiques seraient produites par l'action directe du poison ou indirectement par le passage d'un sang altéré charriant les débris de la destruction globulaire. Ceux-ci finalement se déposent en grande abondance dans le foie ou la rate sous la forme d'un pigment ferrugineux ou sans aucun changement.

La même année, paraît du même auteur (89) une nouvelle contribution à l'étude de l'ictère. Sans présenter de nouvelles expériences, il donne sur la pathogénie de ce symptôme son opinion basée sur ses recherches antérieures avec diverses substances, dont la toluylène-diamine, et dit qu'il faut aban-

donner la dénomination d'ictère hémalogène. Il y a toujours ictère hépatogène ; les pigments biliaires que l'on rencontre dans le sang sont dus à l'action du foie sur l'hémoglobine. La toluyène-diamine ou d'autres poisons analogues détruisent les globules rouges, mettent en liberté l'hémoglobine et l'hémoglobinhémie se produit.

La bile recueillie par fistule biliaire contient beaucoup plus de pigments biliaires, mais peu d'acides biliaires. Dans l'urine également il y a des pigments, mais peu d'acides biliaires. Il y a donc augmentation de la matière colorante de la bile ou pléiochromie, mais pas polycholie. La bile est résorbée dans les voies biliaires, elle est difficilement évacuée à cause de sa consistance muqueuse et s'écoule dans la vésicule qu'elle distend. Rien ne démontre sa résorption dans l'intestin.

Engel et Kiener (23) recherchent avec la toluyène-diamine la formation du pigment ferrugineux et les preuves de la destruction globulaire dans l'accumulation dans les organes de ce pigment, qui peut exister même en l'absence d'ictère et d'hémoglobinurie, avec seulement une profonde anémie.

Chez le lapin, ils n'observent jamais l'ictère, rarement l'hémoglobinurie, cependant on trouve beaucoup de pigment ferrugineux dans le foie, la rate, la moelle des os. Les chiens, qui succombent quelques heures après une dose massive, ne présentent pas d'augmentation de pigment dans la rate et la moelle des os.

Les chiens, qui ne meurent qu'au bout de 1 à 3 jours, ont au contraire une accumulation souvent considérable de pigment ferrugineux dans la rate, la moelle des os. La formation du pigment n'exige donc pas plus de 24 heures. Ils ne savent pas pourquoi on peut en trouver une plus grande quantité dans un de ces tissus que dans l'autre. Ils pensent que le pigment se forme aux dépens de l'hémoglobine diffusée dans la cellule ; le sulfhydrate d'ammoniaque donne en effet une coloration noire diffuse de la cellule et le pigment ne se réunit en gouttelettes que plus tard, quand il devient abondant. Il est aussi moins constant et en plus faible quantité dans le foie ; une partie provient de la rate par la veine splénique.

Dans les intoxications chroniques, l'ictère est peu intense,

apparaît tardivement et il se produit une grande anémie ; dans la rate, la moelle des os, le foie, il y a plus de pigment que dans les cas aigus ; on en trouve dans le rein et les ganglions lymphatiques abdominaux. Le fer qui s'accumule dans l'organisme est donc éliminé par le foie et le rein et les lymphatiques le ramènent en partie dans le foie. Ils trouvent dans le foie et la rate de trois jeunes chiens les quantités de fer suivantes, exprimées en milligrammes, contenues dans 1 gr. de tissu frais :

	FOIE	RATE
	—	—
Chien normal	0,098	0,1617
— empoisonnement 1 jour	0,127	0,1862
— — 45 —	0,294	0,441

Ils donnent également les quantités de fer trouvées dans la moelle des os, le rein, les ganglions lymphatiques abdominaux.

En 1891 paraît à Stuttgart un ouvrage important sur l'ictère et ses différentes formes, où Stadelmann (90) fait un exposé complet de ses nombreuses expériences sur la sécrétion biliaire et surtout sur les ictères toxiques.

En 1896, Hunter (48) vérifie et complète les recherches de ses prédécesseurs sur l'action de la toluylène-diamine.

Il voit se produire un ictère prononcé ; l'urine renferme des pigments et des acides biliaires et la bile est épaisse et visqueuse. Elle obstrue temporairement les voies biliaires et cause ainsi l'ictère. Les voies biliaires sécrètent une grande quantité de mucus sous l'influence de l'irritation produite par le toxique et la bile est ainsi épaissie. Le duodénum est congestionné, surtout au niveau de l'ampoule.

Pour lui, tous les ictères auraient le même mécanisme, ceux des maladies infectieuses comme ceux déterminés par l'acide pyrogallique, le phosphore, l'hydrogène sulfuré, les inhalations d'éther et de chloroforme. Ils seraient tous produits par l'irritation des voies biliaires due à l'intoxication morbide ou expérimentale. Ce sont des ictères hémohépatogènes et non hématoxogènes ou hémolytiques purs.

En 1898, Meunier (79), dans sa thèse faite dans le laboratoire

de physiologie de la Sorbonne, cherche avec des poisons des globules à obtenir dans les organes des accumulations de pigment ocre ou rubigine, dont la localisation correspondrait à celle de la cirrhose pigmentaire.

Après avoir essayé l'effet des hémorrhagies internes sur la production du pigment, il emploie la toluyène-diamine. Il rappelle les dosages d'Engel et Kiener et trouve leurs chiffres bien peu élevés. Il se sert de l'orthotoluyène-diamine en solution à 2 ou 4 % avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique en injections sous-cutanées. Il fait 3 expériences sur des chiens. Dans les 2 premières, les chiens reçoivent dans l'espace de 8 jours 4 injections de 3 ctg. de cette substance. L'un des chiens est sacrifié une semaine, le 2^e un mois après la dernière injection. Leur état général était trop mauvais pour qu'on renouvelât les injections. L'examen de la teneur de leur sang en fer lui montre la production d'une véritable anémie, qui se répare d'ailleurs assez vite par le repos.

Il trouve à l'autopsie chez l'un des chiens des grains de rubigine bien formés, dans des dissociations de la moelle des os, des ganglions mésentériques et de la rate ; dans le foie, il ne voit que des taches jaunâtres, ferrugineuses, qui constitueraient d'après Lapique un stade intermédiaire entre l'hémoglobine et la rubigine. Chez le 2^e chien, sacrifié à une époque plus tardive, les grains de rubigine sont très nets dans la rate et le foie, surtout dans ce dernier ; il y en a peu dans les ganglions mésentériques et pas du tout dans la moelle osseuse. Là les taches jaunâtres seraient arrivées à maturité ; la rubigine serait formée et aurait diminué et disparu des ganglions mésentériques et de la moelle. Le pigment se formerait donc avec la toluyène-diamine dans le tissu hépatique par une succession de stades.

Dans sa 3^e expérience, il administre de petites doses répétées de toluyène-diamine presque quotidiennes, 1 ctg. par kg. (16 injections en 22 jours). A ce moment, le chien malade depuis quelques jours meurt. Il avait présenté un ictère constant. La recherche de la teneur en fer de son sang montre qu'il n'a jamais eu d'anémie au cours de sa déglobulisation. La rubigine existe dans la rate, la moelle des os, les ganglions lymphatiques abdominaux et le foie.

Les dosages du fer dans le foie et la rate de ces 3 expériences donnent le tableau suivant :

TOLUYL. PAR KG.				FER FOIE	FER RATE
I.	9 kg	12 ^{cmo}	(4 inj., survie + longue)	0,42	1,00
II.	8 kg 4	12 -	4 —	0,34	0,94
III.	13 kg	17 -	17 —	0,54	0,48

CHAPITRE II

Isotonie. — Résistance globulaire. — Hématolyse.

Un grand nombre de travaux ont été publiés, surtout dans ces dernières années, sur la question de l'isotonie, de la résistance globulaire, de l'hématolyse. Nous en donnerons un rapide aperçu, ne pouvant analyser en détail, ce qui nous entraînerait trop loin, toutes ces importantes publications. On trouvera d'ailleurs, dans la thèse toute récente de Bousquet (11) et dans Fulloni (26), une étude très documentée de ce point intéressant de la physiologie. Bousquet s'est surtout occupé de l'isotonie, Fulloni de la résistance globulaire. Nous ne saurions trop signaler l'important travail de ce dernier auteur, où, après une analyse très complète des diverses publications sur la résistance du sang jusqu'en 1897, on pourra lire une critique raisonnée de toutes les méthodes d'évaluation de cette résistance.

Dès 1867, puis en 1895, Duncan signale la faible résistance des globules rouges.

En 1872, Malassez, cherchant un liquide pour la numération des globules, remarque que ceux-ci se comportent différemment dans les diverses solutions salines, que l'action d'une même solution n'est pas identique sur tous les globules d'un même sang, et surtout sur ceux de sangs différents, que l'altérabilité globulaire varie suivant les conditions physiologiques et pathologiques.

En 1873 et 74, il s'aperçoit (56-59) que les globules sont plus résistants dans l'anémie saturnine et très peu résistants chez les cancéreux et les tuberculeux.

En 1879, Hayem (45) et Renault (86) trouvent que les globules des différentes espèces animales n'ont pas la même vulnérabilité et que celle-ci varie suivant diverses conditions.

En 1880, Chanel (16) trouve la résistance des globules plus grande dans le sang artériel, dans le sang de l'adulte que dans celui de l'enfant et du vieillard, sans rapport avec le nombre des globules et leur richesse en hémoglobine, diminuée dans beaucoup de maladies, la chlorose, la cirrhose hépatique, la tuberculose, augmentée dans le cancer et l'ictère.

En 1879-80 et 1885, Murri (81-82), après de nombreuses recherches, remarque que dans l'hémoglobinurie paroxystique et dans la syphilis les globules résistent moins au refroidissement qu'à l'état normal.

La tension osmotique est alors étudiée sur les plantes. Sur une fleur fanée, le protoplasma se contracte, ne tapisse plus la paroi de la cellule. Il y a plasmolyse. Cette même fleur étant mise dans l'eau, le protoplasma reprend sa turgescence. Si elle est placée dans des solutions salines graduées, on voit que dans l'une d'elles le protoplasma d'une moitié de ses cellules est turgescent, tandis qu'il ne l'est pas dans l'autre moitié. Cette solution est isotonique avec le suc protoplasmique, il y a équilibre entre eux. On peut obtenir des solutions isotoniques avec différents sels. Ces solutions contiennent des quantités de sels proportionnelles à leurs poids moléculaires. Ainsi il y a isotonie entre les solutions de NaCl à 0,585 %, de nitrate de potassium à 1,01 %, les poids de ces sels étant 58,5 et 101. Toutes ces constatations expérimentales ont été faites par de Vries (100-102). Mais cette règle n'est pas valable pour tous les sels ; il faut tenir compte à la fois du poids et de la structure de la molécule. De Vries et Massart (72) ont établi les coefficients isotoniques d'un certain nombre de corps.

Bientôt après, Hamburger (34) recherche si l'action des solutions salines est la même sur les globules rouges et si les coefficients isotoniques de de Vries peuvent servir pour le sang. Il trouve des chiffres concordants. Le nitrate de potassium en solution à 1 % est isotonique avec les globules du bœuf ; la solution à 1,04 est hypertonique ; celle à 0,96 hypotonique, c'est-à-dire que l'he-

moglobine quitte les globules et diffuse dans la liqueur en lui donnant une coloration rouge. C'est le phénomène de l'hématolyse. Il signale ensuite un certain nombre de solutions isotoniques avec le même sang. Nous y relevons les solutions de NaCl à 0,585 % et de $C^2 O^4 K^2$ à 1,245 %, que nous utiliserons plus tard. Il obtient les mêmes résultats avec du sang vieux de 2 à 6 jours, avec du sang de porc ; il faut d'autres concentrations pour celui de grenouille. Il y a quelques différences pour les divers animaux ; elles sont faibles d'un individu à un autre d'une même espèce.

Hamburger établit alors sa méthode des globules rouges. Il prend 16 éprouvettes contenant chacune 10 cmc. de solution de NaCl pur dans l'eau distillée à 0,30 — 0,32 — 0,34 — 0,60 %. Il introduit dans chaque éprouvette 1/2 cmc. de sang recueilli par saignée et défibriné, agite pour bien mélanger et laisse reposer. Après 24 heures, il recherche la diffusion de l'hémoglobine dans le liquide. Mais il lui faut prendre par la saignée environ 30 cmc. de sang. Ce procédé ne peut donc être utilisé en clinique humaine. Il reconnaît plus tard (1895) qu'on peut réduire à 2 gouttes le sang à mettre dans chaque éprouvette.

En 1885, Ehrlich (22) constate que dans l'hémoglobinurie paroxystique la résistance globulaire n'est pas différente de ce qu'elle est à l'état sain.

Maragliano en 1884, puis de 1885 à 1887, étudie (67-68) dans une série d'expériences ce que devient le sang extrait des vaisseaux, abandonné à lui-même ou soumis à divers agents physiques ou chimiques. La résistance est appréciée sous les formes les plus diverses. L'ensemble de ses recherches, appliquées à la clinique, montre que, dans la plupart des infections chroniques et d'une façon spéciale dans la syphilis et la tuberculose, la résistance des globules est profondément touchée et que l'état fébrile n'a pas d'influence spéciale. Les maladies chroniques du foie, particulièrement l'hépatite interstitielle, diminuent remarquablement la résistance et peuvent

prendre place, à ce point de vue, à côté des infections chroniques. Les soi-disant maladies du sang n'altèrent pas également la résistance des globules. Il y a des formes d'oligémie dans lesquelles les altérations de résistance sont considérables, mais ces altérations n'existent pas dans d'autres.

En 1886, Kowaleski (50) étudie un peu différemment l'hématolyse. Elle se produit lorsqu'on ajoute par centimètre cube de sang 0 g. 20 des sels suivants : NaCl, NaBr, KCl, KI et KCyS. Elle n'a pas lieu avec 0 g. 05 à 0,50 de sulfate, phosphate ou carbonate de soude, de sulfate de potassium ou de chlorure de zinc.

La même année, Hamburger (35) recherche quelle quantité d'eau il faut ajouter au sang pour produire l'hématolyse. Pour le sang de bœuf, par exemple, elle commence avec 50 % d'eau.

En 1887, il trouve (37) que, quelle que soit la concentration de ses solutions, il obtient l'hématolyse avec l'acide borique, la glycérine, le chlorure d'ammonium, l'urée ; que celle-ci se produit par élévation de la température, à moins que les solutions ne soient plus concentrées, et que la concentration est légèrement abaissée avec du sang défibriné.

La même année, Mosso (80) signale de très grandes différences dans la résistance des globules chez les différents animaux, les individus d'une même espèce et chez les mêmes individus suivant les circonstances. Il rappelle les recherches de Bernstein, Becker, Landois, qui ne présentent pas une exactitude suffisante, dont les méthodes sont peu pratiques et insiste sur la grande importance de cette question en pathologie. Il emploie deux autres procédés.

Dans le premier procédé, il examine sous le microscope le sang recueilli dans une solution de NaCl à 3 ‰ avec 1/5000 de violet de méthyle. Avec du sang pas très résistant, il voit bientôt beaucoup de globules rouges s'altérer, beaucoup de noyaux se colorer en violet (plaquettes de Bizzozero), certains corpuscules pâlir, d'autres

se colorer plus ou moins. Avec du sang peu résistant, il emploie la solution sodo-méthylque de Bizzozero.

Dans le second procédé, il cherche le titre de la solution de NaCl qui dissout le plus de globules rouges. Il prépare une série de tubes avec 20^{cmc} des solutions de NaCl de 0,76 à 0,40 % par 0,02. Il verse dans chacun 20^{mmc} de sang aspiré avec une pipette graduée, après piqure de la peau. Il trouve facilement le titre de la solution où tous les globules ne se dissolvent pas et où le liquide demeure opalescent, alors que la solution voisine, où tous les globules sont dissous, devient aussitôt transparente. Il remarque par ce procédé la grande résistance des globules des animaux à jeun et notamment des grenouilles et des tortues à la fin de l'hiver, de même que les grandes variations de résistance chez l'homme, à l'état physiologique, ainsi qu'il le constate le même jour sur les personnes qui fréquentent son laboratoire. La dissolution des globules se faisant parfois avec une grande lenteur, on peut le lendemain voir dans quelle solution commence le dépôt des globules.

Mosso a déterminé de cette façon que la résistance oscille chez le chien entre 0,75 et 0,60 et entre 0,50 et 0,48, et, dans quelques cas rares à sang très résistant, entre 0,44 et 0,42. Quelques chiens enfin avaient les globules si délicats que la dissolution était totale dans la solution à 0,75. Pour les lapins, la résistance oscille entre 0,54 et 0,52 et entre 0,52 et 0,50. Chez les oiseaux, dont les globules sont le plus résistants, il trouve 0,16 à 0,10.

En 1888, Devoto (69) trouve que le bisulfate de quinine, l'antipyrine, l'antifébrine n'apportent pas d'altération appréciable à la résistance des globules.

Castellino étudie la résistance dans diverses maladies, telles que le rhumatisme polyarticulaire, la pneumonie, la fièvre typhoïde, la tuberculose.

En 1889, Féré (25) signale chez les épileptiques pendant leurs crises une augmentation des hématies et une altération plus facile.

En 1890, Hamburger (38) constate la perméabilité des

globules à l'eau, aux sels et autres substances des solutions salines auxquelles ils sont mélangés; il voit que les globules, sans perdre de leur matière colorante, cèdent de même une partie de leurs éléments, comme les chlorures, phosphates et albumines. La force attractive de l'eau reste constante. On peut retrouver les chiffres d'isotonie de diverses solutions en recherchant le moment où l'hémoglobine commence à diffuser dans le liquide ambiant.

Dans d'autres expériences (39), cherchant l'effet des injections de solutions hyper et hypotoniques sur des chevaux, il remarque que la force hydrophile des globules sanguins est restée la même et que la quantité du sang est diminuée.

Maragliano et Castellino (70) s'aperçoivent que le sérum des maladies infectieuses aiguës a une action nuisible sur les globules rouges, tandis que celui des sujets sains a une action éminemment conservatrice.

Limbeck (55), employant la méthode de Hamburger, étudie l'isotonie des globules et l'hyperisotonie du sérum. L'isotonie des globules varie peu, mais l'hyperisotonie du sérum subit des oscillations très grandes sous des conditions physiologiques et pathologiques.

Laker (51), employant le procédé de Rollet, utilise des décharges électriques sur le sang.

En 1891, Castellino (13) voit que la lymphe de Koch produit une diminution du nombre des globules, de l'hémoglobine et de la résistance globulaire. Il signale également diverses variations de la résistance dans les maladies.

Vicarelli (95) trouve pendant l'accouchement et l'allaitement une notable diminution de l'isotonie.

Cavazzani (15), avec des injections de bichlorure, détermine une notable augmentation de la résistance globulaire.

En 1892, Agostini (4) s'occupe de l'isotonie du sang chez les aliénés.

Hamburger, en 1892 et 1893 (40-44), étudie l'influence

de la pression, de l'acide carbonique, des acides et des alcalis sur le sang défibriné et sur la perméabilité des globules rouges. Le sang de la carotide n'a ni la même tension osmotique, ni la même composition que celui de la jugulaire. Cela est dû en partie à l'acide carbonique. Il le prouve en faisant passer du CO_2 sur du sang in vitro. La perméabilité globulaire est modifiée complètement, mais le passage d'un gaz indifférent leur rend leur perméabilité primitive. On voit l'importance de cette constatation pour l'explication des échanges respiratoires. Il y a échange entre les éléments des globules et le plasma; un grand nombre des substances cédées au plasma par les tissus gagnent le poumon avec les globules pour être oxygénées. Elles abandonnent alors les hématies par suite de modifications osmotiques et regagnent le plasma. Les acides minéraux ont sur les globules la même action que l'acide carbonique; la potasse a une action inverse. Les globules sont extrêmement sensibles aux acides et alcalis. Les alcalis les protègent contre un certain nombre de substances hémolytantes.

Hamburger trouve en outre que ces résultats obtenus avec le sang défibriné sont applicables au sang total.

En 1893, Gallerani (27-29) cherche à évaluer la résistance de la combinaison entre l'hémoglobine et le stroma globulaire dans le jeûne. Déjà Mosso et Hermann s'étaient occupés de cette question. Il emploie la méthode de Mosso et détermine, avec le sang d'un animal bien nourri, puis du même animal à jeun, le titre de la solution de NaCl dans laquelle l'hémoglobine commence à se dissoudre, et de celle dans laquelle toute l'hémoglobine est dissoute. Il prépare 25 solutions de NaCl titrées à 3 — 3,2 — 3,5 — 3,7, etc. jusqu'à 9 ‰, prend 10 cmc. de chacune dans une éprouvette et y laisse tomber 2 ou 3 gouttes de sang. Il agite légèrement et, aussitôt le dépôt formé, il détermine au moyen de l'hémomètre de Fleischl la quantité pour 100 d'hémoglobine dissoute dans les diverses solutions. Ses expériences portent sur des

chiens et des grenouilles. Le jeûne dans quelques cas est prolongé jusqu'à 21 jours.

En prenant les résultats d'une de ses expériences, on voit que, chez un chien bien nourri, la précipitation de l'hémoglobine commence à se faire dans la solution à 3,3 et est terminée dans la solution à 5,5 ‰, que la proportion d'hémoglobine dissoute est de 14 % dans la solution à 4 ‰ et de 4,2 dans la solution à 5 ‰ de NaCl. Chez le même chien, après un jeûne de 5 jours, la précipitation commence à 3,5 et finit à 4,7; en outre il y a 11 % d'hémoglobine dissoute dans la solution à 4 ‰ et 0 % dans la solution à 5 ‰ de NaCl. Les résultats sont encore plus évidents avec un jeûne plus prolongé. Les expériences sur les grenouilles donnent des résultats analogues.

En somme, on voit que dans le jeûne la dissolution de l'hémoglobine commence dans des solutions de NaCl moins concentrées et se termine dans des solutions plus concentrées qu'après une abondante alimentation, c'est-à-dire que les limites entre lesquelles se fait la dissolution se rapprochent et que la résistance moyenne de l'hémoglobine est augmentée. Le sang contiendrait diverses sortes d'hémoglobine, plus ou moins adhérentes au stroma et en quantité différente chez l'animal bien nourri ou à jeun. L'hémoglobine la plus résistante, de même que la moins résistante, c'est-à-dire celles des deux extrémités de l'échelle, disparaîtraient dans le jeûne.

Vivenza (99) confirme l'assertion d'Hammarsten que le sang de la veine splénique est plus résistant que celui de l'artère.

Ottolenghi (83) trouve la résistance diminuée dans les asphyxies de cause mécanique et encore davantage dans les asphyxies toxiques. L'hydrogène arsénié, le chlorate de potasse, l'acide nitrique, la strychnine, l'ammoniaque, l'acide phénique produisent de l'hypoglobulie et de l'hypoisonie. Le sublimé augmente la résistance.

En 1894, Viola (96) observe dans la malaria une aug-

mentation de la résistance globulaire, surtout après une série d'accès, mais les résistances minima et moyenne ne suivent pas la même courbe. Dans la malaria chronique, la résistance tend à revenir à la normale. Il trouve également une augmentation de la résistance dans la leucémie et l'ictère. Les globules jeunes seraient plus résistants.

Bottazzi (8), chez des animaux ayant subi la thyroïdectomie, trouve une légère augmentation de la résistance globulaire dans les premiers jours et une diminution à une période plus avancée de la cachexie strumiprive. La résistance varie encore suivant la race et dans le jeûne, où il observe une diminution qui augmente jusqu'au 12^e jour.

Castellino (14) remarque que dans les anémies graves le bichlorure de mercure à dose élevée augmente la résistance des globules et diminue l'hémoglobinhémie. Il propose les injections de sublimé dans ces affections.

Bianchi-Mariotti (6) observe qu'à doses élevées les injections de produits solubles de divers bacilles (strep-tocoque, choléra, etc.) diminuent le pouvoir isotonique du sang, qu'à petites doses elles l'augmentent et que les faibles doses répétées n'ont aucune influence sur lui, d'où l'adaptation des animaux aux toxines et l'élimination de celles-ci par l'organisme.

Bottazzi (9) trouve sur des chiens dératés une augmentation de la résistance des globules qui s'accroît progressivement, puis devient permanente.

Chwostek (17) trouve la résistance des hématies normale dans un cas d'hémoglobinurie paroxystique.

En 1895, Cutore (18) observe une diminution de la résistance globulaire in vitro avec le bichlorure de quinine; il détermine des variations insignifiantes de l'isotonie chez l'homme sain. Il étudie l'effet de ce bichlorure sur la résistance du sang dans un certain nombre de maladies.

Viola et Jona (98) recherchent les altérations du sang après la saignée. Ils constatent notamment après une

abondante soustraction de sang une diminution rapide de la résistance globulaire, puis le retour à la normale.

Bianchi-Mariotti (7), avec des inoculations de micro-organismes vivants et assez virulents, produit une diminution assez forte de la résistance des hématies, qui varie suivant la quantité de culture, le degré de virulence, le mode d'introduction et revient bientôt à la normale, si la dose n'est pas mortelle.

Zanier (104) trouve le sang fœtal doué d'une résistance plus grande et moins uniforme que celui de la mère.

Domenici (20) confirme les assertions de Bottazzi sur la résistance globulaire après l'extirpation de la rate.

Bottazzi (10) observe avec les injections de peptone d'abord une légère diminution de l'isotonie, puis une légère augmentation sur la normale.

Gley et Langlois (31) trouvent une diminution de la résistance globulaire chez les lapins thyroïdectomisés.

De Dominicis (21) augmente la résistance globulaire en même temps que les globules et l'hémoglobine dans des transfusions de sang de chien chez l'homme.

Viola (97), dans un cas d'hémoglobinurie paroxystique a frigore, ne trouve pas de diminution de la résistance; celle-ci augmente après quelques accès. Le froid et l'acide carbonique n'ont pas plus d'influence sur elle que chez les personnes saines. Il trouve des variations de la résistance chez les syphilitiques.

Gangitano (30) observe un accroissement continu de la résistance des hématies chez les chevaux soumis à des injections immunisantes contre la diphtérie.

Pour Langlois (52), les sels de cadmium diminuent l'isotonie, ceux de zinc ne l'influencent pas.

En 1895, Puglise (84) trouve au moyen du spectroscope de la méthémoglobine dans le sang circulant des batraciens. Elle est d'origine endoglobulaire, car le sérum après centrifugation est incolore. Elle reste pendant plus de 3 mois.

Il constate également (85) que le venin de crapaud a

une action méthémoglobinogène sur le sang de crapaud hors de l'organisme.

La même année, Manca (64) étudie l'influence de la cocaïne sur la résistance des globules rouges. Il emploie la méthode de Hamburger. Il mélange 1^{cmc} d'une solution de cocaïne à 10^{cmc} de sang défibriné, laisse en contact de 20 minutes à 3 heures, agite et laisse tomber des gouttes de ce mélange dans 5^{cmc} de diverses solutions de NaCl à 4 — 4,25 — 4,50.... 6 ‰; puis il examine ces solutions au bout de 17 heures. La résistance des globules est modifiée inégalement chez les divers animaux.

Il étudie de même (65) l'influence de la fatigue musculaire sur la résistance des globules rouges. Dans des solutions graduées de NaCl de 3 à 7 ‰, il laisse tomber 1 goutte de sang d'un chien fatigué, agite, laisse reposer et cherche la solution où les globules commencent à céder leur hémoglobine. Il voit que la fatigue musculaire a une action sur l'altérabilité des globules, mais ne va pas jusqu'à l'hémoglobinurie. Les produits engendrés par l'activité musculaire font donc varier la résistance des globules, de même que les acides et les alcalis ajoutés au sang par Hamburger.

Jona (49) constate l'indépendance absolue, au point de vue de la résistance, des globules rouges du sang maternel et du sang du fœtus. La résistance minima du sang du fœtus est inférieure à celle du sang de la mère; la résistance moyenne est presque toujours inférieure; le plus souvent la résistance maxima est plus élevée. La faible résistance du sang du fœtus est due à sa richesse en eau. Aussitôt après la naissance, la résistance minima augmente rapidement, probablement à cause d'une destruction subite des globules; quelques jours après, les résistances moyenne et minima s'élèvent et dépassent celles de l'adulte, à cause de l'épaississement progressif du plasma.

Pour ces constatations, Jona emploie le procédé de Viola. Il verse dans une série d'éprouvettes 5^{cmc} d'une solution de NaCl de 0^g 20 à 0,70 ‰ en augmentant de

0,02. Il laisse tomber 4 gouttes de sang. Les premières éprouvettes sont transparentes, puis on en voit une trouble, qui indique la résistance moyenne. Il établit la résistance minima comme Hamburger et la résistance maxima par la recherche au microscope, après formation du dépôt, des derniers globules, en descendant l'échelle de concentration.

En 1896, Grijins (32) remarque que certaines substances, parmi lesquelles l'urée, ont, en solution de concentration quelconque, la même action sur les globules que l'eau distillée et passent aussi facilement qu'elle à travers les hématies.

Malassez (61) trouve que la solution de NaCl à 7,5 ‰ n'est pas la plus physiologique ; elle diminue le diamètre des globules, augmente leur épaisseur. Les solutions voisines de 10 ‰ et même un peu supérieures les conservent mieux. Il donne de même le titre des solutions de sulfate de sodium, de bichromate de potassium, d'acide osmique, qui diminuent ou augmentent le diamètre des globules.

Vaquez et Marcano (91), dans un cas d'hémoglobinurie paroxystique, ont vu, au moment des accès, une diminution de la résistance des hématies, en même temps que de l'hypoglobulie.

Cutore (19) vérifie de nouveau la diminution de la résistance des globules avec la quinine dans la malaria, où l'isotonie est élevée. Chez les individus sains, l'isotonie ne subit pas de modifications appréciables par la quinine.

Manca (66) s'occupe du sang laissé à la température extérieure sans précautions aseptiques et trouve une diminution progressive de la résistance.

Fulloni (26), après un historique très complet de la question de la résistance globulaire, que nous avons mis largement à contribution, apprécie les méthodes fondamentales d'évaluation de cette résistance et les réduit à cinq catégories : destruction de tous les globules au moyen de solutions déterminées, numération de ceux-ci

dans des liquides conservateurs, action de l'électricité, modifications chromatiques et morphologiques des hématies par certains agents physiques et physico-chimiques, isotonie.

Nous ne pouvons, sans sortir du cadre restreint que nous nous sommes imposé, en dire davantage sur cet intéressant chapitre, où l'on peut puiser des renseignements fort utiles sur ces diverses méthodes, qui sont appréciées dans les moindres détails avec beaucoup de compétence.

A propos de l'isotonie, Fulloni passe en revue les procédés de Hamburger, Mosso, Vicarelli, Agostini, Gallerani, Vivenza, Bisio, Manca, Viola, Bottazzi, Cutore et d'une façon générale apprécie la valeur de cette méthode.

Pour ses expériences personnelles, il emploie les chiens et les lapins. Il met 5 gouttes de sang dans 10^{cmc} des solutions de NaCl titrées de 0,20 à 0,70, en augmentant de 0,02 ; il agite immédiatement, évite le contact des gouttes de sang avec le verre de l'éprouvette, opère à la température de 20°, enfin cherche à éviter toutes les causes d'erreur, notamment celles qu'il a indiquées chez les autres. Il étudie d'abord les conditions extrinsèques qui ont une influence sur le degré de la résistance ; il signale le sel et l'eau des solutions, la quantité de sang employée, le contact du sang avec le verre de l'éprouvette, la manière de mélanger le sang dans les solutions, la température de celles-ci, l'état hygrométrique, la lumière et l'obscurité, la température à laquelle a été conservé le sang extrait, la défibrination, la conservation du sang hors des vaisseaux.

D'autres conditions dépendant de l'animal ont aussi leur influence ; ainsi la résistance varie suivant l'espèce (il trouve pour la résistance minima 48-50 chez l'homme, 50-52 chez le lapin, 58-60 chez le chien) ; suivant l'âge et le sexe (l'isotonie semble suivre une courbe parallèle à la parabole de la vie, la résistance étant faible chez les individus jeunes de la même race, augmentant avec l'âge et se retrouvant diminuée dans la vieillesse, de même

qu'elle est plus grande dans le sexe masculin qu' dans le féminin).

Parmi les autres causes d'influence, il signale le genre et le degré d'alimentation, le jeûne, à l'occasion duquel il critique les résultats obtenus jusqu'ici, la digestion, le travail, la température externe, les bains locaux et généraux, froids ou chauds, la congestion et l'anémie locales, les injections hypodermiques d'éther, d'alcool camphré, de sérum artificiel, ces dernières produisant une augmentation rapide de la résistance, l'anesthésie chloroformique, qui s'accompagne d'une diminution considérable de la résistance. Enfin il faut tenir compte encore de la région à laquelle on a pris le sang et de la richesse du sang en globules et en hémoglobine.

Fulloni fait ensuite quelques recherches cliniques sur la résistance du sang avec la méthode de l'isotonie. Il ajoute sa statistique aux précédentes, espérant qu'en multipliant et coordonnant ses observations on arrivera à des résultats intéressants. Il passe en revue les affections les plus diverses. Il rencontre généralement une diminution de la résistance, qui suit assez la marche de la maladie, mais qui présente parfois une courbe toute spéciale qu'on ne sait comment interpréter. La résistance est influencée en effet suivant une infinité de circonstances dépendant ou non de la maladie. Ses résultats ne lui permettent donc pas d'émettre de conclusions autrement précises.

En 1897, Hamburger (44^{bis}) trouve que le sang est le seul milieu qui conserve la forme des globules rouges. Même dans les solutions physiologiques ou isotoniques de NaCl, leur diamètre est diminué, ils perdent leur forme concave, deviennent plus ou moins sphériques. Ils reprennent cet aspect biconcave si, au sortir des solutions salines, on les remet dans leur sérum naturel.

Hédin (46), dans un travail très important, avec de nombreuses expériences *in vitro* sur des substances de toutes sortes, sels minéraux, corps organiques de fonctions diverses, détermine la quantité de chacune de ces

substances en solution qui passe dans les globules rouges et les variations du volume de ces globules.

Vaquez (92) insiste sur la nécessité, dans les recherches sur l'isotonie ou l'hématolyse, d'utiliser des liquides stériles et du sang recueilli aseptiquement. Sans cela on pourra commettre des erreurs. Il a pu, en procédant ainsi, conserver dans des solutions de NaCl à 8 ‰ du sang pendant fort longtemps sans altération notable et sans dissolution manifeste de l'hémoglobine. Il n'obtenait pas cela avec des solutions non stériles. Il conseille l'asepsie, même quand l'examen ne demande que quelques heures.

En 1898, Hamburger (44^{ter}) voit que les acides carbonique, chlorhydrique et sulfurique gonflent les hématies et qu'inversement les alcalis diminuent leur volume. Les globules prennent plus d'acide que le sérum ; l'inverse a lieu pour les alcalis.

Vaquez (93) mentionne l'insuffisance des méthodes propres à évaluer la résistance des globules, ce qui fait que les résultats obtenus jusqu'ici n'ont pas l'importance qu'ils devraient avoir. Il s'attache à modifier les procédés d'Hamburger et de Mosso en y joignant l'étude qualitative du mode de résistance et de destruction des globules.

Il adopte le procédé suivant : il mélange une partie de sang recueilli par piqûre du doigt au moyen d'une pipette graduée à 100 parties de chacune des solutions de NaCl titrées de 4 en 4 ctg. pour ‰, de 0,22 à 0,62. Il commence habituellement au chiffre 0,50 et descend jusqu'à la solution où le sang se dissout totalement. On le voit facilement, mais on s'en assure par l'examen microscopique d'une goutte du liquide. On ne doit plus y trouver aucun globule. D'ailleurs les tubes conservés 24 heures servent encore de contrôle. On a ainsi le chiffre correspondant à l'hématolyse totale ou quantitative. Il est très variable et correspond habituellement à 0,38 ‰ de NaCl. Pour avoir l'hématolyse qualitative, il faut chercher la solution où l'hématolyse s'arrête. On peut

procéder comme Gallerani, mesurer au colorimètre l'intensité de la dissolution de l'hémoglobine, ou faire des numérations successives des globules dans diverses solutions salines ou à des intervalles variés, comme le font Chanel et Malassez, mais ces numérations sont infidèles ou insuffisantes.

Il mélange une partie de sang à 200 des solutions salines suivantes: trois espacées de 4 en 4 ctg. immédiatement supérieures à la solution de l'hématolyse totale et trois à 0,50 — 0,70 — 0,82, puis fait la numération des globules 6 heures après. Les chiffres obtenus, il dresse une courbe partant de la solution de l'hématolyse totale et remontant à la solution où le sang ne se détruit plus. C'est l'échelle hématolytique. Ce procédé est applicable à la clinique.

Masoin (71) détermine la dose mortelle pour la grenouille et le lapin d'un certain nombre de substances (nitrate de soude, aniline, chlorate de soude, acétanilide), qui produisent la destruction des globules et la formation de méthémoglobine dans le sang. Les sels alcalins et en particulier le carbonate de soude ont une action préventive vis-à-vis de cette intoxication, action à la fois antitoxique générale et antiméthémoglobinisante et peuvent donc être utiles pour lutter contre de telles intoxications.

Camus et Gley (12), dans un important travail, étudient l'action physiologique du sérum d'anguille. Nous ne nous occuperons que de la partie qui a trait à l'action sur le sang. Le sérum d'anguille cause des phénomènes toxiques; le principe actif n'en est pas connu, mais il a une puissante action dissolvante sur les globules rouges du sang; c'est une substance globulicide. Les globules rouges du hérisson, qui présentent une grande résistance, ne sont pas détruits; de même le sérum chauffé n'est plus globulicide et le sérum d'animaux immunisés contre le sérum d'anguille est fortement antiglobulicide. On sait que le sérum du sang d'une espèce animale est globulicide pour le sang d'une autre espèce.

Il arrive souvent, après les injections intra-veineuses de sérum d'anguille, de voir l'iris devenir rouge, une hémorrhagie nasale et de l'hémoglobinurie se produire. Si l'on centrifuge du sang artériel, le plasma prend une coloration rouge due à l'hémoglobine dissoute. Souvent l'urine contient des globules rouges et de l'hémoglobine.

Pour se rendre compte de cette action, ils utilisent la méthode de Hamburger avec le procédé de Mosso-Viola. Ils recherchent la résistance des globules rouges du sang du lapin dans des solutions de NaCl à divers titres, ou la facilité avec laquelle les globules laissent diffuser leur hémoglobine.

Dans des tubes bien propres, stérilisés, ils introduisent 5^{me} de chacune des solutions de NaCl, puis une goutte de sang recueillie aseptiquement. Ils examinent les tubes 16 et 24 heures après et jugent de la diffusion par la coloration. Leurs solutions de NaCl varient de 0,48 à 0,70 % par 0,02 ctg. La résistance globulaire chez le lapin correspond habituellement aux solutions de 0,58 ou 0,60. Cette première série de tubes étant ainsi faite, ils procèdent à une deuxième série de tubes dans lesquels, avant de laisser tomber une goutte de sang, ils introduisent une goutte de sérum d'anguille dilué, par rapport aux solutions salines, à des titres variables.

Ils constatent alors une diffusion très nette de l'hémoglobine dans toutes les solutions hyperisotoniques, avec du sérum dilué de 1/100 à 1/10000° et même parfois jusqu'à 1/20000°. Ces résultats sont représentés graphiquement par des courbes d'une lecture facile. Les mêmes résultats ont été obtenus avec du sang de cobaye, mais le sang de hérisson est réfractaire. Le sérum d'anguille, qui est très alcalin, ne perd pas son pouvoir globulicide par la neutralisation.

En résumé, ce sérum a une action globulicide intense et détermine de l'hémoglobinhémie, de l'hémoglobinurie et les phénomènes toxiques dépendant de cette destruction des globules rouges.

Tout récemment, en 1899, Vaquez et Bousquet (94),

s'appuyant sur l'abaissement du point de congélation du sérum dans certaines affections, comme l'urémie et le diabète, signalent le danger qu'il peut y avoir à employer en injections intra-veineuses des solutions salines trop peu concentrées par rapport au sérum sanguin et conseillent dans les cas pathologiques d'avoir recours à la solution de NaCl à 10 ‰ ou de pratiquer seulement des injections sous-cutanées.

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE III

Moyens d'étude

Comme nous l'avons déjà indiqué au début, nos expériences peuvent être réparties en deux séries. Dans la première, nous avons étudié l'action de la toluylène-diamine sur les chiens au moyen des signes physiques, des constatations de l'autopsie et de l'examen histologique des principaux organes, mais nous avons eu surtout en vue la recherche de la rubigine dans les viscères dans des cas d'intoxication prolongée et le dosage du fer contenu dans le foie et la rate.

Dans la seconde série, nous avons uniquement étudié les altérations du sang à l'aide du microscope, du spectroscope, du procédé de l'isotonie et du dosage de l'hémoglobine dissoute dans des solutions salines graduées.

Ces deux séries d'expériences ont ceci de commun, c'est qu'il s'agit toujours de l'action de la toluylène-diamine sur les globules rouges, que nous recherchons d'abord dans le sang circulant, puis que nous retrouvons à un stade plus éloigné dans les organes sous la forme d'un pigment ferrugineux.

Nous avons employé le chlorhydrate de toluylène-diamine 1. 2. 4, préparé par Nitzberg. Nos premières expériences ont été faites avec un produit qui était depuis quelques mois dans le laboratoire et dont la coloration était devenue légèrement grisâtre; puis nous avons utilisé la même substance, immédiatement après sa prépa-

ration et cette fois incolore. Nous avons pu ainsi obtenir des solutions non colorées et reprendre quelques-unes des expériences de Stadelmann sur le sang *in vitro*. 1 gr. de chlorhydrate de toluylène-diamine renferme 0 gr. 62 de base; le chlorhydrate est donc à poids égal moins toxique. En outre, il se dissout très bien dans l'eau froide, tandis que pour y dissoudre 1 gr. de base il faut ajouter un acide, par exemple 2 gr. d'acide chlorhydrique ordinaire.

Nous avons expérimenté uniquement sur des chiens ou sur du sang provenant de ces animaux. Nous nous sommes en effet exercé d'abord pendant longtemps au maniement du colorimètre ou à la recherche de l'isotonie avec du sang des chiens employés aux autres expériences du laboratoire et nous avons pu bientôt obtenir des résultats identiques avec deux séries faites avec le même sang. Nous avons pu aussi de cette façon transformer complètement, par suite de perfectionnements successifs, le procédé de dosage colorimétrique primitivement adopté par nous.

Nous n'avons jamais utilisé pour l'administration de notre substance la voie veineuse ou la voie gastrique; nous avons eu recours aux injections sous-cutanées et à titre exceptionnel aux injections péritonéales. Mais nous avons bientôt abandonné ces dernières, que nous avons accusées quelquefois de provoquer des vomissements, du péritonisme et d'amener plus rapidement la mort. En effet la toluylène-diamine, même en solution étendue, est assez toxique et nous a semblé trop irritante pour une séreuse aussi délicate que le péritoine. En tous cas l'intoxication paraît plus intense par cette voie.

Le chlorhydrate de toluylène-diamine se dissout très facilement dans l'eau froide. Nous l'avons surtout employé à 1/50 dans la solution de NaCl à 8 ‰. L'absorption nous semble ainsi plus rapide qu'avec l'eau distillée. Cherchant à utiliser cette grande solubilité, nous avons fait quelques solutions à 1/20 et même à 1/10, que nous trouvions très précieuses pour injecter, sous un faible

volume, une dose assez forte chez un chien de 15 à 20 kg. Mais, en solution aussi concentrée, la toluylène-diamine est très toxique et nous avons eu bientôt à nous en repentir. Il se produisait une violente irritation de la séreuse péritonéale et sous la peau le liquide injecté n'était pas absorbé. Nous ne pouvions cependant expliquer ce fait par un manque d'asepsie. La collection liquide sous-cutanée augmentait bientôt, en même temps que l'état général devenait mauvais et la peau s'ulcérait, si le contenu de la poche n'était pas évacué. En reprenant notre solution à 1/50, ces inconvénients ne se sont plus reproduits.

Nous avons été amené dans nos expériences à faire quelques dosages du fer contenu dans le sang et dans les organes. Nous ne dirons que quelques mots des procédés que nous avons employés et nous renvoyons pour la description complète à la thèse de doctorat ès-sciences de Lapique (53).

Pour faire le dosage du fer du sang, on prend, au moyen d'une pipette graduée, 1/10 de cmc. de sang de l'oreille d'un chien et on le reçoit dans 5 cmc. d'eau distillée ; on ajoute une goutte d'ammoniaque pour éclaircir. La dilution est à 1/50. Après avoir au colorimètre amené une solution d'hémoglobine à l'égalité de teinte avec un étalon titré en fer, on remplace l'étalon par la solution à doser. L'égalité de teinte étant de nouveau trouvée, on lit le nombre correspondant. Le nombre qui correspond à l'étalon, divisé par le chiffre du dosage, donne un quotient qui exprime en centièmes de milligramme par gramme le fer du sang.

Le dosage du fer d'un tissu se fait différemment. S'il s'agit du foie, on peut doser le fer du parenchyme indépendamment de celui du sang des vaisseaux en le lavant. Pour cela, il faut opérer au moment même où l'animal est sacrifié, c'est-à-dire avant toute coagulation. On fait passer, par l'intermédiaire d'une canule placée dans la veine porte, une certaine quantité d'eau salée à 8 ‰ sous une pression convenable. Le liquide s'écoule par

les vaisseaux cervicaux sectionnés. Le foie se décolore rapidement sous les yeux.

Cela fait, on prend un poids de tissu renfermant environ 1 milligramme de fer, on l'introduit dans un ballon et on y ajoute environ 1 cmc. d'acide sulfurique par gramme de substance. On chauffe jusqu'à ce que l'intérieur du ballon soit devenu transparent, puis on ajoute de l'acide azotique goutte à goutte, en continuant à chauffer jusqu'à ce que le liquide ait pris une coloration vert clair. Après refroidissement, on ajoute de l'eau et on fait bouillir à nouveau pour dissoudre tout le précipité cristallin. Il reste alors à faire le dosage au colorimètre au moyen du sulfocyanate d'ammoniaque, qui donne une coloration rouge plus ou moins forte avec une solution ferrique.

On a préalablement cherché à quelle division correspond une solution ferrique titrée colorée par le sulfocyanate et amenée à l'égalité de teinte avec un étalon spécial pour ce dosage. Cette solution ferrique contient 1 millig. de fer par 20 cmc. ; on en prend 20 cmc., que l'on mélange à 5 cmc. d'une solution de sulfocyanate d'ammoniaque à 10/100. Ce nombre trouvé, soit e , qui est généralement 50 avec notre étalon, on remplace dans le godet du colorimètre l'étalon par une petite quantité du mélange obtenu en versant 5 cmc. de sulfocyanate d'ammoniaque dans la solution à doser, que l'on a préalablement amenée à 20 cmc. en y ajoutant de l'eau distillée. On établit de nouveau l'égalité de teinte et on lit le nombre trouvé, soit e' . $\frac{e}{e'} =$ en milligrammes la quantité de fer contenue dans le poids du tissu. Une simple division donne le poids du fer par gramme.

Nos pièces pour l'examen histologique ont été fixées dans les liquides de Zenker ou de Lindsay, immédiatement après avoir sacrifié l'animal, pour pouvoir examiner les tissus dans de bonnes conditions. Nous avons employé comme colorants la safranine seule, ou combinée avec le vert lumière ou le violet de gentiane. Les tissus fixés dans le Lindsay ne pouvaient servir pour la

recherche du fer par le sulfhydrate d'ammoniaque ; l'acide osmique que contient le Lindsay colore en effet la graisse en noir et la distinction eût été difficile. Nous n'avons donc employé le sulfhydrate d'ammoniaque qu'avec les préparations fixées par le Zenker ou sur des dissociations de tissu frais. Les grains de rubigine apparaissent d'ailleurs nettement sur ces dissociations sans emploi de sulfhydrate. Le pigment se distingue assez bien sur les préparations colorées, mais il se voit encore mieux sur les coupes non colorées et montées avec la gelée à la gélatine. Enfin, pour faire apparaître le fer contenu dans les cellules, nous avons aussi utilisé le procédé décrit par Hall (33). Il consiste à placer pendant 24 heures de petits morceaux des tissus à examiner dans un mélange de 30^{me} de sulfhydrate d'ammoniaque et de 70^{me} d'alcool absolu, à les faire passer successivement dans les alcools à 70°, 80°, 90°, 95° et absolu et à les inclure dans la paraffine. Puis les coupes sont fixées sur le porte-objet, débarrassées de leur paraffine et ensuite placées pendant 20 minutes dans un mélange de 1,5 % de ferrocyanure de potassium et de 0,5 % d'acide chlorhydrique. Elles sont alors lavées, traitées par l'alcool et le xylol et montées dans le baume au xylol.

Dans notre étude des altérations du sang sous l'influence de la toluyène-diamine, nous avons cherché à expliquer le mécanisme de l'intoxication par cet agent. On admet jusqu'ici que la toluyène-diamine agit par dissolution des globules, par mise en liberté de l'hémoglobine. Lopicque, recherchant l'hémoglobine dissoute dans le plasma, en avait trouvé une petite quantité. Nous en avons vu également, mais seulement avec des doses très fortes et en quantité insuffisante, il nous semble, pour expliquer la teneur élevée en fer des organes. Nous avons donc cherché un autre mécanisme, celui de l'altérabilité, de la fragilité des globules et nous avons songé à évaluer la résistance globulaire dans des solutions salines au moyen de l'isotonie et de notre procédé de dosage colorimétrique.

L'examen du sang est fait, comme nous l'avons dit, au moyen du microscope, du spectroscope, de la recherche de l'isotonie et du dosage de l'hémoglobine dissoute dans des solutions salines graduées. Nous avons aussi, dans quelques expériences, cherché à déterminer le moment d'apparition de l'hémoglobine dans le plasma et l'action de la toluyène-diamine sur le sang *in vitro*.

Pour l'examen microscopique, le sang est étalé en couche mince sur le porte-objet et desséché rapidement soit à la flamme, soit sur des vapeurs osmiques, ou il est recueilli dans le sérum conservateur d'Hayem. Les préparations de sang sec sont colorées ou examinées directement. Nous avons essayé aussi de faire quelques numérations des globules, mais avec les doses massives que nous employons les globules sont fortement déformés et entourés de granulations qui leur adhèrent plus ou moins, de produits de destruction, de stromas incolores ; aussi cette méthode présente de grandes difficultés.

Nous avons eu souvent l'occasion de rechercher au spectroscope les spectres d'absorption de l'oxyhémoglobine et de la méthémoglobine. On sait qu'il y a deux matières colorantes du sang, l'oxyhémoglobine et l'hémoglobine. Elles ne sont pas normalement dissoutes dans le plasma sanguin, mais fixées solidement sur les globules rouges. Dans certains cas pathologiques, cette union est rompue et les matières colorantes passent dans le plasma. Il y a hémoglobinhémie.

Avec une solution d'oxyhémoglobine convenablement diluée, on constate l'existence de deux bandes d'absorption très nettes, très sombres, comprises dans la région jaune vert du spectre solaire, entre les raies D et E. Celle qui est près de D est un peu plus sombre et moins large. Avec une solution renfermant un peu plus d'oxyhémoglobine, les deux bandes augmentent de largeur, s'étalent l'une vers l'autre et vers D et E. Avec une solution encore plus concentrée, les deux bandes d'absorption viennent au contact de D et de E. L'oxyhémoglo-

bine augmentant, les deux bandes se confondent en une bande unique dont les bords s'étendent au delà de D et de E. Enfin tout le spectre peut être absorbé sauf le rouge et le rouge orangé.

La méthémoglobine est un autre composé oxygéné de l'hémoglobine. Elle se produit aux dépens de l'hémoglobine, sous l'influence de certains agents oxydants, de même qu'avec certains agents réducteurs elle fournit de l'hémoglobine. En solution aqueuse, elle présente un spectre d'absorption à 3 bandes, une dans le rouge entre C et D et deux entre D et E. Les solutions alcalines de méthémoglobine présentent aussi 3 bandes dont les 2 premières sont toutefois un peu déplacées vers la droite. Nous avons souvent constaté ce dernier spectre.

Les globules rouges formés d'un stroma incolore et de pigment rouge ont un volume variable. Ils se gonflent dans des solutions aqueuses de sels neutres très diluées et se ratatinent dans des solutions concentrées. Si l'on introduit du sang dans des solutions aqueuses de sels neutres, le volume des globules est augmenté, ne change pas ou est diminué suivant la composition de ces solutions. Certains auteurs appellent solutions isotoniques au sérum sanguin celles qui ne changent pas le volume des globules, hyperisotoniques celles qui le diminuent et hypoisotoniques celles qui l'augmentent. La véritable isotonie serait en effet celle où les globules ne changent pas de volume, mais on a vu d'autre part qu'ils se gonflent dans la solution isotonique de Hamburger et qu'ils ne changent pas de volume dans la solution de NaCl à 10 ‰ par exemple, qui est une solution hyperisotonique pour Hamburger. Ces phénomènes ne sont donc encore qu'imparfaitement connus et la question est trop complexe pour que nous y insistions davantage. Quant à nous, nous considérons l'isotonie comme l'entend Hamburger; sans nous occuper du volume des globules, nous cherchons uniquement la diffusion de leur matière colorante dans le plasma.

Nous avons procédé à la recherche de l'isotonie, avec

le sang normal et celui recueilli après les injections de toluylène-diamine, d'après la méthode de Hamburger modifiée par Mosso-Viola, mais nous ne nous sommes occupé que de la résistance minima.

Nous employons d'habitude les solutions de NaCl aux titres de 0,50 — 0,54 — 0,58..... 0,78 % par 4 centigr., que dans nos observations nous désignons simplement sous le nom de solutions 50, 54, etc. Nous avons trouvé cette approximation suffisante; dans nos premières expériences elles sont même graduées de 5 en 5 centigr.

Dans de petites éprouvettes bien propres, nous introduisons 5 cmc. de chacune de nos solutions, puis nous y laissons tomber 2 gouttes de sang puisé directement dans l'artère avec la seringue de Pravaz, ou dans le verre, où l'on vient de recueillir le sang, avec un compte-gouttes. Nous agitons immédiatement les éprouvettes et nous examinons de nouveau, de 16 à 24 heures après, l'état de la diffusion. Les solutions sont, ou fortement colorées en rose, et alors on y voit les bandes de l'oxyhémoglobine au spectroscope, ou peu colorées avec diffusion faible, ou incolores.

La méthode de l'isotonie nous donnait déjà des résultats intéressants, mais nous désirions avoir des notions plus complètes sur les variations de la résistance globulaire avant et après l'injection, en cherchant la quantité d'hémoglobine dissoute dans chacune de nos solutions, pour établir une courbe hématolytique.

Les méthodes employées jusqu'ici par Chanelet Lépine, Malassez, Vaquez, et basées sur des numérations successives de globules ne pouvaient nous convenir. Nous pouvions ne pas trop ménager le sang, comme il faut le faire en clinique, et les altérations globulaires produites par notre poison rendaient ces numérations peu commodes. Les opérations nous semblaient en outre délicates et un peu longues. Il faut, en effet, attendre plusieurs heures le dépôt des globules. Une bonne numération exige aussi un certain temps pour être précise et plusieurs numérations sont nécessaires pour établir une courbe.

Suivant les indications de M. Lapicque, nous avons cherché à employer la méthode colorimétrique, qui donne des résultats précis, si l'on prend certaines précautions. Gallerani s'était déjà servi de l'hémomètre de Fleischl, nous avons vu dans quelles conditions, et Fulloni, appréciant sa méthode avec toutes celles employées jusqu'ici, disait qu'elle méritait d'être étudiée davantage. Nous nous sommes proposé, après avoir introduit une petite quantité de sang grossièrement mesurée dans des solutions salines de concentration moléculaire décroissante, d'établir le rapport de l'hémoglobine mise en liberté à l'hémoglobine totale introduite sous forme de globules rouges, ou plus simplement la quantité pour 100 d'hémoglobine dissoute dans chaque solution.

Quelle quantité de sang et de solution saline fallait-il prendre ? Combien de solutions et quelles solutions devions-nous employer ? Telles sont les premières questions que nous nous sommes posées et que nous n'avons résolues entièrement qu'après bien des tâtonnements.

L'appareil à centrifuger mû à la main, ou à la vapeur, contenant 8 tubes, nous nous sommes bientôt décidé à les utiliser tous, de façon à avoir un nombre de déterminations suffisant pour établir une courbe.

Or il nous fallait une solution hypertonique pour la recherche de l'hémoglobinhémie ; il nous restait donc 7 tubes pour le dosage de l'hémoglobine, qui nous suffisaient amplement pour ce que nous cherchions. Toutes nos solutions étaient ainsi centrifugées au même moment et le plus tôt possible après la prise du sang, de façon à donner toutes les garanties de précision.

Après quelques essais, nous avons considéré comme les plus convenables les solutions renfermant 0,26 — 0,30 — 0,34 — 0,38 — 0,42 — 0,46 et 0,50 de NaCl %. Nous avons commencé par prendre 2 cmc. de sang et 80, puis 40 et enfin 25 cmc. de chacune de nos solutions salines. Mais à ce moment nous nous servions de la centrifuge à main, qui ne peut recevoir que des tubes de 8 cm. de longueur sur 2 cm. de diamètre et d'une conte-

nance de 12 cmc. environ. Nous ne pouvions donc centrifuger qu'une faible partie de notre liquide et comme nous devions, après avoir dosé la quantité d'hémoglobine dissoute, déterminer la quantité d'hémoglobine totale de notre sang, il nous fallait réunir le liquide centrifugé, y compris la partie ayant servi au dosage, à celui qui ne l'avait pas été. C'était donc un procédé défectueux, pouvant même amener des erreurs par suite de toutes ces manipulations. La quantité de sang nous semblait aussi un peu grande.

Nous y avons remédié en employant 10^{cmc} de solution saline et 1^{cmc} de sang. Ces 11^{cmc} tenaient très bien dans nos tubes. Tout le liquide était centrifugé en même temps et les manipulations étaient simplifiées. En outre, cette dilution du sang à 1/10 était très convenable et les lectures se faisaient facilement au colorimètre.

Mais un grand inconvénient subsistait encore. Comme nous avions un certain nombre de tubes à remplir, il nous arrivait quelquefois malgré toutes nos précautions, quand le sang coulait lentement par une canule un peu étroite, ou quand l'agitation des solutions n'était pas faite immédiatement, ou pour d'autres causes, de trouver un caillot plus ou moins volumineux dans nos mélanges après centrifugation. Or une solution qui renferme un caillot quelconque doit être jetée immédiatement; il est inutile de faire un dosage qui ne sera pas précis. Un seul caillot dans une série faisait manquer toute notre courbe. Nous avons voulu y remédier.

Nous avons songé à défibriner notre sang, ce que l'on fait souvent, mais nous sommes d'avis que du sang défibriné n'est plus du sang tout à fait normal. On sait en effet que les contacts mécaniques altèrent un certain nombre de globules.

Une petite quantité d'oxalate, 1 à 2‰, suffisait pour empêcher la coagulation du sang par action sur les sels de chaux, mais en ajoutant cette quantité juste suffisante le titre de nos solutions était modifié. Il fallait donc obtenir des mélanges de chlorure de sodium et d'oxalate

ayant exactement la même action sur les globules que nos précédentes solutions.

Or, de Vries a montré chez les plantes qu'on peut obtenir des solutions isotoniques avec différents sels, que ces solutions contiennent des quantités de sels proportionnelles à leurs poids moléculaires, qu'il y a par exemple isotonie entre les solutions de NaCl à 0,585 % et de nitrate de potassium à 1,01 %, parce que les poids de ces sels sont de 58,5 et de 101. Bientôt après, Hamburger trouvait des chiffres concordants pour les globules rouges.

Nous servant de cette règle, nous avons trouvé qu'il y avait isotonie entre les solutions de NaCl à 0,585 % et d'oxalate de soude à 1,34 %, les poids de ces sels étant 58,5 et 134.

Rien n'était plus facile alors que de préparer nos mélanges. Par un calcul très simple, nous établissons

qu'à une sol. de NaCl à 2,6 ‰ correspond une sol. d'oxalate de soude à 5,95 ‰

—	3	—	—	6,87
—	3,4	—	—	7,78
—	3,8	—	—	8,70
—	4,2	—	—	9,61
—	4,6	—	—	10,53
—	5	—	—	11,45

A 10 parties d'une solution de NaCl, nous ajoutons 1 partie de la solution oxalatée correspondante, ce qui était suffisant pour empêcher la coagulation ; mais nous aurions pu aussi bien mettre une égale quantité des deux solutions salines. Ces solutions chlorurées oxalatées nous ont servi dans la plus grande partie de nos expériences.

Cependant cette règle, basée sur les poids moléculaires, n'est pas valable pour tous les sels ; il faut en effet tenir compte à la fois du poids et de la structure de la molécule (1). Ces nouveaux liquides n'étaient donc pas exactement du même titre isotonique que nos premières

(1) C'est la question qu'on exprime par le *coefficient isotonique* : NaCl, sel d'acide monobasique, ayant pour coefficient 3 ; $C_2O_4Na_2$, sel d'acide bibasique, ayant pour coefficient 4.

solutions uniquement chlorurées. Cela d'ailleurs n'avait pas d'importance pour nous, qui ne cherchions que des variations proportionnelles de la résistance globulaire et à aucun moment de chiffre absolu.

Néanmoins, par une dernière modification, nous avons remplacé l'oxalate de sodium par l'oxalate de potassium, dont Hamburger lui-même avait vérifié le titre de la solution isotonique par rapport à celle de NaCl.

Il établit en effet que les solutions de NaCl à 0,585 % et d'oxalate de K à 1,245 % sont isotoniques ; or, si le poids moléculaire du NaCl est 58,5 — celui de l'oxalate n'est pas 124,5 mais 166. En établissant nos solutions d'oxalate de potassium d'après le poids moléculaire, elles auraient été un peu plus concentrées que les correspondantes de NaCl.

Pour obtenir rapidement ces dernières solutions, que nous considérons comme correspondant exactement à celles de NaCl, on peut procéder de la façon suivante : on prépare une certaine quantité de la solution la plus concentrée et on la dilue plus ou moins pour obtenir toutes les autres, au lieu de peser chaque fois la quantité de sel qu'on doit mettre dans chacune. Ce procédé est d'ailleurs beaucoup plus juste. On trouve facilement qu'à la solution à 5 ‰ de NaCl correspond la solution à 10,64 ‰ d'oxalate de K. On mélange donc 3 litres de la solution de NaCl à 5 ‰ à 3 litres de la solution de $C^2 O^4 K^2$ à 10,64 ‰. On prend un litre du mélange, qui correspond à la solution de NaCl à 5 ‰. Pour avoir un litre de solution correspondant

à la sol. de NaCl à 4,6 ‰ on en prend	920 ^{cmc}	et	80 ^{cmc}	d'eau
—	4,2	—	840	160 —
—	3,8	—	760	240 —
—	3,4	—	680	320 —
—	3	—	600	400 —
—	2,6	—	520	480 —

Ces solutions, que nous avons expérimentées, nous semblent les meilleures pour le dosage de l'hémoglobine. Elles sont composées par moitié de solutions chlorurées

et oxalatées. Il y a beaucoup d'oxalate et on n'a pas à craindre de caillot. Néanmoins, il faut avoir soin d'agiter les tubes immédiatement après l'introduction du sang, pour que le mélange se fasse bien.

Nous avons encore employé une solution, que nous désignons le plus souvent simplement sous le nom d'hypertonique, pour la recherche de l'hémoglobinhémie et qui a la composition suivante: NaCl 10 gr., oxalate de soude 6 gr. pour 1000 d'eau distillée. Dans 10 cmc. nous introduisons généralement 1 ou 2 cmc. de sang.

Nous avons déjà dit que nous faisons pour chaque solution un dosage de l'hémoglobine dissoute et de l'hémoglobine totale du sang introduit. L'instrument dont nous nous servons pour la mesure du sang est la seringue de 1 cmc. de Pravaz, ou de Strauss, de préférence aux pipettes graduées. Elle doit être bien propre, bien sèche, et avoir un piston fonctionnant bien. Avec elle, on opère très rapidement et on peut remplir tous ses tubes en quelques secondes, c'est-à-dire bien avant le début de la coagulation du sang. Il faut avoir soin de bien tirer le piston à fond, sans laisser pénétrer de bulles d'air, de façon à avoir toujours à peu près la même quantité de sang. On y arrive facilement et on peut constater que les chiffres correspondant à l'hémoglobine totale sont sensiblement égaux ou même identiques. D'ailleurs, nous ne cherchons pas à prendre une quantité de sang mesurée d'une façon précise, puisque nous dosons chaque fois l'hémoglobine totale, et on ne commettrait aucune erreur en ne mettant pas dans tous les tubes la même quantité de sang. Les pipettes graduées exigent beaucoup plus de temps pour la mesure du sang; il peut ainsi s'y former plus facilement des caillots. Le sang y est aussi beaucoup plus en contact avec les parois de verre, ce qui est mauvais.

Pour dissoudre tous les globules avant le dosage de l'hémoglobine totale, nous avons commencé par employer quelques gouttes d'éther. L'éther dissout bien les globules, mais la solution obtenue est trop foncée et on

est obligé ensuite de la diluer plus ou moins pour faire des lectures plus précises. Or l'eau distillée étant aussi un excellent dissolvant, nous avons bientôt abandonné l'éther et dilué immédiatement d'une quantité égale ou double d'eau suivant l'intensité de la coloration du liquide, en ajoutant 11 ou 22 cmc. d'eau distillée. On rectifie ensuite la lecture en divisant le nombre trouvé par 2 ou par 3. On sait en effet que, pour faire usage du colorimètre dans les meilleures conditions, il faut que le nombre de divisions trouvé pour l'hémoglobine soit aux alentours de 50 et en tous cas supérieur à 20.

Avec toutes ces modifications, nos lectures au colorimètre devenaient assez précises. Nous le constatons en faisant 2 séries de solutions identiques avec le même sang.

Voilà donc maintenant comment nous opérons : dans 8 tubes numérotés, de 8 cm. de hauteur et de 2 cm. de diamètre, nous versons 10 cmc. de chacune de nos solutions salines. Nous avons dit pour quelles raisons nous préférons celles que nous avons employées en dernier lieu et qui renferment du chlorure de sodium et de l'oxalate de potassium. Pour simplifier, nous les désignons sous le nom de solutions 26, 30, etc., c'est-à-dire d'une valeur isotonique correspondant à 2,6 — 3 etc., ‰ de NaCl. Nous versons de même dans le 8^e tube 10 cmc. de notre solution hypertonique contenant 10 de NaCl et 6 de $C^2 O^4 Na^2$ pour 1000.

Après avoir découvert une artère, la fémorale par ex., nous y adaptons une canule de calibre convenable. Nous faisons une prise de sang aussi petite que possible, 10 cmc. environ, que nous recevons dans un verre. Avec une seringue de 1 cmc. nous introduisons très rapidement 1 cmc. de sang dans chacune de nos solutions. Nous agitions immédiatement les tubes avant de faire la ligature de l'artère. Les solutions sont ensuite centrifugées, soit avec l'appareil à main, soit avec l'appareil à vapeur. Cela demande environ dix minutes. Tout est prêt pour la colorimétrie.

A moins que l'on ait un excellent étalon à hémoglobine, disque en verre coloré, on opère avec plus de précision avec une solution d'hémoglobine (quelques gouttes de sang dans de l'eau distillée et une goutte d'ammoniaque). C'est le plus souvent d'une telle solution que nous nous sommes servi. L'étalon est mis dans un des godets du colorimètre, cette solution est placée dans l'autre ; on établit l'égalité de teinte et on remplace l'étalon par chacun des liquides à examiner. On suit les règles habituelles de la colorimétrie, grande propreté des godets et des cylindres plongeurs, emploi d'une quantité juste suffisante de liquide pour que les cylindres plongent bien et que le liquide ne déborde pas, surtout si l'on emploie une cuve étroite, qui permet les dosages avec une quantité de liquide très faible, descente des cylindres à fond pour chasser les bulles d'air.

Pour chaque solution nous avons à faire 2 lectures au colorimètre, la première avec l'hémoglobine dissoute dans le liquide qui après centrifugation se tient au-dessus du dépôt des globules et que nous pouvons désigner plus simplement sous le nom de plasma ; la seconde avec l'hémoglobine totale de la solution, comprenant celle qui est dissoute et celle qui est restée dans les globules.

Le plasma doit être versé délicatement dans le godet, en ayant soin de ne pas déplacer les globules du dépôt. Après avoir trouvé la division qui correspond au plasma d'une solution, il est préférable de faire immédiatement la lecture du nombre correspondant à l'hémoglobine totale de cette solution, avant de passer au plasma suivant.

Nous avons déjà dit que, pour que la lecture présente toutes les garanties de précision, il faut dans certains cas par une dilution déterminée ramener à une intensité de coloration convenable, mais on a rarement besoin de le faire pour l'examen du plasma. Il n'en est plus de même pour l'hémoglobine totale. Après avoir réuni le plasma, qui vient d'être examiné, aux globules du dépôt, on dilue d'une quantité égale ou double d'eau, suivant

le degré de coloration que l'on veut obtenir et on divise le nombre trouvé au colorimètre par 2 ou par 3.

Nous pouvons établir de la façon suivante que les nombres fournis par l'hémoglobine dissoute et par l'hémoglobine totale du sang nous permettent d'obtenir la quantité % d'hémoglobine dissoute dans chaque solution saline. Soit i l'intensité de coloration de l'hémoglobine totale, i' celle de l'hémoglobine dissoute dans les solutions salines, e l'épaisseur lue pour l'hémoglobine totale, e' celle de l'hémoglobine dissoute dans les mêmes solutions.

Il est de règle en colorimétrie que l'intensité de coloration est proportionnelle à la teneur en matière colorante, pour des teneurs qui ne sont pas trop différentes, et que les épaisseurs lues sont inversement proportionnelles à ces intensités de coloration, ce qu'on peut exprimer ainsi :

$$\frac{i}{i'} = \frac{e'}{e}$$

Si nous désignons par q la quantité d'hémoglobine totale de notre sang et par q' la quantité d'hémoglobine dissoute dans les solutions salines, nous obtenons :

$$\frac{q}{q'} = \frac{i}{i'} = \frac{e'}{e} \text{ ou simplement } \frac{q}{q'} = \frac{e'}{e}$$

Supposons que $q = 100$; il nous reste comme inconnue q' .

Or nous pouvons écrire :

$$\frac{100}{q'} = \frac{e'}{e}$$

d'où q' (ou la quantité d'hémoglobine dissoute) $= \frac{100 \cdot e}{e'}$

Donc en multipliant par 100 le chiffre de la 2^e lecture et en divisant par celui de la première, on a la proportion % d'hémoglobine dissoute.

Supposons par exemple que $e = 13$ et $e' = 25$, on a $1300 : 25 = 52$.

L'hémoglobine totale égalant 100, on a 52 pour l'hémoglobine dissoute.

Avec un peu d'habitude, on peut faire le dosage complet pour les 7 solutions en une 1/2 heure et l'opération complète demande environ 1 heure. Il nous semble que le temps très court de l'expérience ne nécessite pas l'asepsie recommandée par certains auteurs.

Lorsque la quantité d'hémoglobine contenue dans le plasma est très faible, la comparaison se fait mal au colorimètre avec la solution d'hémoglobine qui sert d'étalon. On peut cependant dans quelques cas faire encore un dosage très exact en diluant plus ou moins cette solution. La teinte de la solution étalon importe peu en effet dans la recherche de notre rapport pourvu qu'elle soit la même pour les deux lectures.

Lorsque l'on connaît la quantité d'hémoglobine dissoute dans chacune des solutions, rien n'est plus facile que d'établir une courbe hématolytique, que l'on construit de la façon suivante : sur la ligne des ordonnées, on porte la proportion d'hémoglobine diffusée et sur la ligne des abscisses le titre des solutions salines de 26 à 50. On réunit ensuite les points déterminés.

Enfin, nous avons dans quelques expériences essayé de déterminer le moment d'apparition de l'hémoglobine dans le plasma du sang circulant. Pour cela, nous prenons une quantité à peu près égale de sang et de notre solution saline renfermant NaCl 10 et oxalate de soude 6 pour 1000. Après centrifugation, si la solution est colorée en rose au-dessus du dépôt des globules et montre au spectroscope les bandes de l'oxyhémoglobine, il y a hémoglobinhémie. Nous opérons toujours avec deux tubes pour nous assurer qu'une cause d'erreur n'a pu altérer les globules.

CHAPITRE IV

Résultats de nos expériences

Les symptômes que nous avons constatés sur nos chiens après des injections de chlorhydrate de toluylène-diamine ont été assez variables suivant les doses.

Dans nos premières expériences, dont l'une a duré plus de deux mois et où nous injectons chaque jour une quantité extrêmement faible de notre substance, nos chiens n'ont à aucun moment paru bien malades.

Ils étaient très anémiques, leurs muqueuses étaient pâles ; ils ont bien eu aux conjonctives un léger subictère constant, mais nous n'avons jamais pu constater dans l'urine par une recherche systématique une réaction de Gmelin caractéristique, ni la présence d'acides biliaires. L'urine d'ailleurs n'a jamais eu une coloration nettement ictérique. Elle était généralement de couleur jaune clair. Ce sont donc surtout des signes de faiblesse, d'anémie, de dénutrition, d'abattement modéré, d'inappétence, que nous avons vus. L'urine renfermait de temps en temps un léger nuage d'albumine ; quant à la recherche de l'urée, elle ne nous a donné aucune indication de quelque valeur. Mais ce que nous avons constaté d'une façon très nette, c'est l'accoutumance très grande de l'animal aux poisons. Nous avons pu injecter chez nos chiens, qui depuis plusieurs semaines recevaient chaque jour des quantités croissantes et d'abord très faibles de toluylène-diamine, et sans produire visiblement une réaction bien nette, des doses qui chez des chiens sains déterminaient une profonde intoxication avec hémoglobinurie et même amenaient rapidement la mort.

Dans d'autres expériences sur des chiens robustes, nous avons donné dès le premier jour en les espaçant les doses qui pouvaient produire le maximum d'effet sans

déterminer la mort et nos animaux ont présenté des symptômes d'intoxication beaucoup plus prononcés.

Ils étaient dans le plus grand abattement, ne mangeaient plus, restaient couchés dans leur cage, leurs selles étaient colorées par la bile et le plus souvent liquides, ils avaient des vomissements, leur urine était nettement ictérique et on y constatait la présence d'hémoglobine ou de méthémoglobine. Ils arrivaient en peu de jours à une grande maigreur, puis, si de nouvelles injections ou des injections plus fortes n'étaient pas faites, ils se remettaient petit à petit.

Nous avons remarqué, en outre, une assez grande différence dans l'action de la toluylène-diamine suivant les animaux. Telle dose qui produit tel effet chez un chien n'aura pas du tout la même action chez un autre chien. Il ne faut pas seulement, il nous semble, tenir compte du poids dans l'appréciation de la dose convenable.

La résistance varie suivant l'âge, la race, l'état du chien très variable chez nos animaux de laboratoire. De très jeunes chiens ou de très vieux ne résistent pas comme des adultes ; il y a des différences aussi entre ceux qui ont une nourriture abondante et de bonne qualité et ceux qui par leur aspect misérable semblent avoir subi des privations.

Les résultats de l'autopsie ont été un peu variables, suivant le mode d'intoxication employé. Chez les chiens traités pendant un grand nombre de semaines avec de faibles doses quotidiennes, l'ictère des organes était peu marqué, on trouvait surtout des signes d'anémie, de la pâleur des muqueuses et des séreuses. Chez ceux qui avaient reçu un certain nombre de doses massives, on constatait une coloration ictérique très intense de tous les organes abdominaux, de l'épiploon, du péritoine. Tous les tissus sous-cutanés, surtout le tissu adipeux, étaient jaunes. Le contenu intestinal était coloré par la bile ; la région de l'ampoule de Vater présentait une coloration beaucoup plus intense que le reste de la muqueuse duodénale. Le foie rouge foncé était généralement

très rempli de sang. La rate hypertrophiée était également riche en sang et de coloration foncée. Les reins étaient congestionnés. La vésicule biliaire était ordinairement distendue par la bile et renfermait une bile très colorée, visqueuse, épaisse. Les voies biliaires étaient perméables. La moelle des os était brunâtre, molle, sans consistance. Le microscope révélait les lésions habituelles de l'intoxication aiguë ; nous les avons décrites à propos de nos expériences. On trouvait de la rubigine dans des dissociations du foie, de la rate, de la moelle des os, avec ou sans l'aide de sulfhydrate d'ammoniaque.

Nous avons fait 8 dosages de fer dans le foie et la rate, dont 4 après lavage du foie. Nous avons obtenu les résultats suivants que nous réunissons dans un tableau :

Expériences	Nombre d'injections	Nombre de centigr. de toluylène par kg.	Fer du Foie		Fer de la rate
			lavé	non lavé	
I	45 (doses faibles)	152		0,58	0,85
II	22 (doses faibles)	46	0,46		1,11
IV	12 (doses fortes)	38	0,68		1,60
V	8 (doses tr. fortes)	36		0,74	1,15
VI	2 (doses tr. fortes)	10		0,39	0,85
VII	2 (doses tr. fortes)	10		0,40	0,70
XI	1 la veille	13	0,09		0,46
XXI	2	6	0,19		0,84

D'après Lopicque, la teneur en fer chez le chien adulte normal est d'environ 0,10 pour le foie et varie de 0,30 à 0,80 pour la rate.

Nous obtenons, comme Meunier, après nos injections de toluylène-diamine, une augmentation relative de fer beaucoup plus considérable dans le foie que dans la rate. Nous avons cru en outre remarquer, bien que nos résultats soient peu nombreux, que ce n'est pas par de faibles doses quotidiennes et longtemps prolongées de toluylène-diamine, qui modifient peu l'état général, que l'on produit la plus grande accumulation de fer, mais plutôt

par quelques doses très fortes, espacées et produisant une forte intoxication, surtout si elles s'accompagnent d'hémoglobinurie. Il nous a semblé également trouver un dépôt de fer plus abondant après des injections péritonéales ayant déterminé une intoxication intense et une réaction péritonéale non douteuse.

Quelques-unes des expériences suivantes sont consacrées à la recherche du moment d'apparition de l'hémoglobinhémie par le procédé que nous avons décrit. Cette recherche, faite systématiquement après l'injection de toluyène-diamine de demi-heure en demi-heure pendant plus de 4 heures, ne nous a pas montré d'hémoglobine dissoute dans le plasma, quelque forte que soit la dose. Dans nos expériences d'évaluation de la résistance globulaire par la colorimétrie, nous n'en avons pas trouvé non plus 5 heures et 5 heures $1/2$ après l'injection, mais le lendemain, c'est-à-dire 20 à 24 heures après, il en existe très souvent. La quantité d'hémoglobine dissoute dans les solutions hypertoniques est en général peu abondante ; elle est à l'état de traces indosables dans les tubes où l'on mélange 1 cmc. de sang pour 10 cmc. de solution saline et ne peut pas modifier sensiblement nos lectures, même avec de très fortes doses de toluyène-diamine.

Nos expériences nous ont permis de constater dans le sang d'autres altérations que la mise en liberté de l'hémoglobine. On sait que le sang normal est coloré en rouge par l'oxyhémoglobine. Quelque temps après l'injection de toluyène-diamine, il prend une coloration brunâtre, qui est même très prononcée avec une dose forte, de sorte que cette teinte s'aperçoit au moment de la découverte du vaisseau, à travers les tuniques de l'artère.

Au microscope, sur des préparations de sang sec ou dans le sérum de Hayem, nous avons retrouvé les altérations globulaires, bien décrites déjà par Afanassiew. Lorsqu'elles sont assez prononcées, les globules rouges sont pâles, décolorés, plus ou moins déformés ou en voie

de destruction; on voit les granulations qu'ils émettent et qui leur adhèrent encore par un appendice grêle ou nagent au milieu du plasma; ces granulations sont très colorées, alors qu'une partie du globule est incolore. Certaines hématies paraissent comme framboisées; d'ailleurs leur forme et leurs dimensions sont très variables de l'une à l'autre. On trouve aussi des hématies complètement incolores et d'une façon constante une grande quantité de globules blancs, dont nous n'avons pas fait la numération. Mais si la dose injectée est faible, les altérations sont bien moins prononcées. On peut ne constater qu'une certaine pâleur des globules, de la poikilocytose, des déformations légères et une augmentation du nombre des leucocytes.

Dans quelques expériences, nous avons étudié l'action de la toluyène-diamine sur le sang *in vitro*. Dans de petites éprouvettes contenant une solution saline hypertonique et un nombre de gouttes croissant d'une solution de toluyène-diamine à 1/50, nous laissons tomber 3 gouttes de sang; mais la coloration brunâtre de notre substance rendait difficile la recherche de la diffusion de l'hémoglobine. Lorsque nous avons eu de la toluyène-diamine incolore, nous l'avons mélangée directement à du sang (expér. 24 et 28) dans des proportions déterminées, et après dissolution et centrifugation, nous avons vu dans le plasma de l'oxyhémoglobine et une bande dans le rouge, que nous croyons être celle de la méthémoglobine.

Le sang recueilli un certain temps après l'injection de toluyène-diamine et dilué avec de l'eau distillée montre au spectroscope le spectre de l'oxyhémoglobine et en outre à une plus forte épaisseur une bande dans le rouge entre C et D. Si l'on ajoute quelques gouttes d'ammoniaque, la bande se déplace un peu vers la droite en pâlisant, sans arriver toutefois jusqu'à D. Ces 2 bandes ne peuvent correspondre qu'aux spectres de la méthémoglobine acide et alcaline. La méthémoglobine, que nous avons retrouvée dans la plupart de nos expériences, n'a pas été à notre connaissance signalée jusqu'à présent

avec la toluylène-diamine. Il est vrai que dans les travaux précédents, dont nous avons donné une analyse très détaillée, les altérations du sang ont été recherchées presque uniquement à l'aide du microscope. Néanmoins Stadelmann signale de l'hématine dans le plasma. Nous sommes d'avis qu'il y a eu erreur. On peut très bien confondre en effet les spectres de la méthémoglobine et de l'hématine acides à cause de leur grande ressemblance, mais si l'on a soin de chercher avec l'ammoniaque le spectre alcalin, il n'y a pas de doute possible. Il s'agit bien de méthémoglobine. D'ailleurs un certain nombre de corps voisins de la toluylène-diamine sont connus comme produisant de la méthémoglobine, tels que l'acide pyrogallique, l'acétanilide, le chlorate et le nitrate de soude, etc.

La méthémoglobine n'apparaît dans le sang qu'avec une dose de toluylène-diamine assez forte ; c'est pourquoi nous ne l'avons pas toujours constatée.

Lorsqu'on examine une solution de sang dans l'eau distillée, on voit d'abord à une faible épaisseur les deux bandes de l'oxyhémoglobine entre C et D, puis à une épaisseur plus grande, s'il y a beaucoup de méthémoglobine, on voit une raie dans le rouge ; mais si la quantité de méthémoglobine est très peu considérable, cette dernière raie n'apparaît que quand toute la partie droite du spectre est depuis longtemps absorbée. On a ainsi un moyen rapide d'évaluer approximativement la proportion de méthémoglobine par rapport à l'oxyhémoglobine.

Nous recherchions d'habitude aussi la présence de la méthémoglobine directement dans nos solutions salines après centrifugation. Chacune de nos solutions était examinée directement dans les tubes sous la même épaisseur (2 cm) en descendant l'échelle des concentrations et on notait dans quelle solution commençait à apparaître la raie dans le rouge.

Nous avons aussi constaté, en comparant l'une de ces solutions salines centrifugées à une solution de sang

dans l'eau distillée d'égale intensité de teinte, que sous la même épaisseur les spectres d'oxyhémoglobine et de méthémoglobine observés dans les deux liquides étaient sensiblement les mêmes. Les globules cèdent donc dans l'eau salée la même proportion de leur méthémoglobine et de leur oxyhémoglobine que dans l'eau distillée. Nous n'avons pu trouver de différence sensible.

Les courbes que nous avons figurées au moyen de déterminations colorimétriques sont établies avec des mélanges de sang et d'eau salée à $1/10$ et pour les solutions que nous avons employées. Les rapports que nous avons obtenus n'ont donc pas de valeur absolue, ils n'ont de signification que par comparaison entre eux et seraient différents, nous l'avons constaté, pour les dilutions à $1/20$ ou à $1/40$ à cause de l'intervention de l'hyperisotonie du sérum.

Les solutions dont nous nous sommes servis ne nous ont pas permis d'avoir toute la courbe de l'hématolyse ; dans beaucoup de cas nous n'en avons même que la terminaison, mais elles convenaient mieux pour le sang recueilli après les injections, en laissant voir la partie médiane et la fin de la courbe, qui se rapproche davantage de la résistance minima des globules et qui est la plus intéressante. C'est donc pour de simples raisons de technique que nous ne l'avons pas complète.

Néanmoins, dans certains cas, avec des globules moins résistants nous avons pu obtenir des déterminations en assez grand nombre pour avoir une notion suffisante de la forme de la courbe entière. La courbe hématolytique aurait une forme en grande partie rectiligne ou plus exactement celle d'une S renversée très allongée, ou d'une droite terminée par 2 légères inflexions de sens inverse. Ces deux inflexions correspondant aux limites de l'échelle hématolytique nous font songer aux hypothèses de Gallerani, qui suppose que le sang contient diverses sortes d'hémoglobine plus ou moins adhérentes au stroma globulaire et que celles des 2 extrémités de l'échelle ne présentent pas la même résistance que l'hé-

moglobine intermédiaire. Il nous semble préférable de rattacher ce phénomène à l'existence de différentes espèces de globules, opinion qui a déjà été formulée par divers observateurs et notamment dans ces derniers temps par Vaquez.

Nos dosages colorimétriques avec le sang normal nous ont permis en outre d'observer de grandes variations dans la résistance des globules de nos animaux, ce qui ne se voit pas nettement par la méthode de l'isotonie seule. Bien des causes ajoutent leur influence, parmi lesquelles l'âge, le sexe, la race, l'état d'embonpoint ou de santé. Mais il aurait fallu les rechercher d'une façon plus méthodique et plus complète pour établir des conclusions de quelque valeur. Cela a d'ailleurs été constaté par différents auteurs et par divers procédés.

La courbe obtenue après les injections de toluylène-diamine a sensiblement la même forme que celle du sang normal. On le verra d'après nos graphiques. Mais la résistance globulaire n'est pas la même suivant la dose injectée et le moment de la prise du sang.

Avec une faible dose de toluylène-diamine, ou quelquefois avec une dose moyenne chez un chien adulte, très robuste et en bon état, lorsque l'examen du sang est fait le lendemain, la courbe se juxtapose presque sur celle du sang normal. Il y a seulement parfois une légère augmentation de la résistance globulaire. D'ailleurs le chien n'a nullement l'air malade, il est éveillé et mange comme d'habitude. Cependant dans ces cas nous avons déjà trouvé, il est vrai à l'état de traces, une petite quantité de méthémoglobine dans le sang, mais jamais d'hémoglobinhémie.

Avec une dose forte, produisant une réaction manifeste chez le chien, on observe au contraire une notable diminution de la résistance globulaire. Cette diminution est plus ou moins marquée suivant les cas avec la même dose. Quelquefois, déjà 5 ou 6 heures après l'injection, mais le plus souvent seulement le lendemain, on constate en même temps un changement assez notable dans

la coloration du sang, ainsi que la présence de méthémoglobine en quantité plus ou moins grande et très souvent un peu d'hémoglobinhémie.

Donc avec une dose forte, produisant une réaction non douteuse chez nos chiens, 24 heures après l'injection de toluylène-diamine, nous constatons 2 faits en connexité étroite et dont l'intensité varie toujours dans le même sens : la présence dans le sang de méthémoglobine et la diminution de la résistance globulaire. En outre, le plus souvent il y a hémoglobinhémie. Quand il y a une grande diminution de la résistance globulaire, il y a toujours un peu d'hémoglobinhémie, mais la teinte qu'elle communique à la solution saline est toujours extrêmement faible et ne peut influer sur nos lectures au colorimètre.

On constate donc surtout la liaison de ces deux phénomènes : présence de méthémoglobine et diminution de la résistance des globules. Quand il y a beaucoup de méthémoglobine, il y a une très grande diminution de la résistance globulaire ; quand il y en a peu, il y a une faible diminution de cette résistance. Nous avons même vu qu'il y a apparition d'une trace de méthémoglobine à un moment où on ne constate aucun affaiblissement de la résistance.

Enfin si nous laissons nos chiens se remettre pendant quelques jours et si nous examinons à nouveau l'état de la résistance de leurs globules, nous la trouvons considérablement augmentée par rapport au sang normal recueilli avant l'injection. C'est le phénomène de la réparation normale ; il n'est pas spécial à la toluylène-diamine ; on le remarque par exemple après les saignées. Si une nouvelle injection est alors faite, le lendemain on constate encore une diminution de la résistance globulaire.

Il nous semble donc qu'après l'administration d'une faible dose de notre substance, les hématies sont peu altérées, qu'il y a peu de modification dans l'adhérence de leur matière colorante, ou une très légère exaltation

de la résistance globulaire. Mais nous n'avons jamais étudié l'hyperisotonie du sérum et c'est peut-être de ce côté qu'il faudrait chercher l'explication de ce fait. Il y a là une lacune dans nos recherches. Au contraire, avec de fortes doses, nous assistons à une altération très intense des globules, la matière colorante normale est altérée en partie, il se forme de la méthémoglobine et l'hémoglobine quitte facilement le stroma. Puis, au bout de quelques jours, alors que les globules altérés ont été détruits par les organes hématolytiques, qui les transforment en pigment ferrugineux, on assiste aux phénomènes de réparation du sang et les globules jeunes nouvellement formés sont très résistants.

La recherche de l'isotonie faite avec nos petites éprouvettes et 2 gouttes de sang nous a servi de contrôle ; elle a toujours montré des variations de résistance dans le même sens, mais ne nous a pas donné d'indications comparables comme précision à celles de l'examen colorimétrique.

EXPÉRIENCES

Expérience 1. — Chien de 1 an, 8 kilog. 800. — 2 décembre 1898, prise de sang par piqure de l'oreille, dosage du fer du sang par la colorimétrie $26 : 75 = 0,35$ (quotient exprimé en centièmes de milligram. de fer par gram. de sang). Injection sous-cutanée de 1 ctg. par kg. de chlorhydrate de toluylène-diamine en sol. à 1/50^e dans une sol. de NaCl à 8 0/00. — 3 déc., chien bien portant, inj. de 4 ctg. par kg. — 6 déc., dosage du fer du sang $26 : 82 = 0,32$. Inj. de 4 ctg. par kg. — 7 et 8 déc., inj. de 4 ctg. par kg., pas d'ictère manifeste aux sclérotiques, chien un peu abattu; mange peu. L'examen du sang desséché sur l'acide osmique en sol. à 2/100 les 6, 7 et 8, montre des globules rouges de dimensions très différentes, pâles, un peu altérés et beaucoup de globules blancs. — 9 et 10 déc., inj. de 4 ctg. par kg.; dosage du fer du sang $26 : 86 = 0,30$. — 12 déc., nouvel examen du sang, poikilocytose légère, inj. de 4 ctg. par kg. — 13, 14 et 15 déc., inj. de 4 ctg. par kg.; pas d'ictère manifeste; recherche de l'isotonie avec 2 gouttes de sang pour 5^{ème} de solution; on voit la diffusion de l'hémoglobine très nette dans les sol. de NaCl à 4 et 4,5 0/00 qui ont une coloration rosée et donnent au spectroscope les 2 raies de l'oxyhémoglobine, faible dans les sol. à 5-5,5 et 6 et nulle dans les sol. à 6, 5 0/00 et suivantes, qui sont incolores. — 16 déc., réact. de Gmelin sans résultat dans l'urine, inj. de 4 ctg. — 17 déc., inj. de 4 ctg. — 19 déc., pas d'ictère prononcé, augmentation de la dose, inj. de 2 ctg. par kg. — 20 déc., inj. de 2 ctg. — 21 déc., sclérotiques un peu subictériques, pas de pigment biliaire dans l'urine, inj. de 2 ctg. par kg. — 22, 23 et 24 déc., inj. de 2 ctg. par kg., mange bien, léger nuage d'albumine, pas

de réaction de Gmelin nette. — 26 déc., inj. de 2 ctg., pas de réact. de Gmelin manifeste. — 27 déc., inj. de 2 ctg. par kg. — 28 déc., la présence de l'ictère étant toujours douteuse malgré un nombre déjà grand d'injections, nous augmentons encore la dose, inj. de 3 ctg. par kg. Le chien a été plus malade les jours suivants et a très peu mangé. — 6 et 7 janv. 1899, inj. de 3 ctg. par kg. — 9 janv., inj. de 3 ctg. par kg. Les réactions de Gmelin et de Pettenkofer sur l'urine ne donnent aucun résultat net. — 10 janv., pas d'ictère appréciable aux sclérotiques, mange bien, paraît peu malade; nous augmentons la dose. Inj. de 4 ctg. par kg. Urine jaune foncé, dosage de l'urée avec l'appareil Regnard = 6 gr. 405 d'urée par litre. — 11 janv., urine jaune foncé, pas de réaction de Gmelin, pas d'ictère plus marqué aux sclérotiques; urée = 24 gr. 339 par litre. — 11 et 12 janv., inj. de 4 ctg. par kg. — 13 janv., chien assez vif, ictère toujours peu appréciable, pas de réact. de Gmelin, léger nuage d'albumine, urée = 16 gr. par litre, inj. de 4 ctg. par kg. — 16 janv., inj. de 4 ctg. par kg. — 17 janv., inj. de 4 ctg. par kg., urine jaune clair, très légère trace d'albumine, pas de réaction de Gmelin, urée = 6 gr. — 18 janv., inj. de 4 ctg. par kg., même état, supporte très bien ces injections, n'a toujours pas l'air malade. — 19 janv., inj. de 4 ctg. par kg., urine jaune clair, pas de réaction de Gmelin, 7 gr. 686 d'urée. — 20 janv., inj. de 4 ctg., mange bien, urine jaune clair, pas de Gmelin, urée = 10 gr. 248. — 21 janv., inj. de 5 ctg., urine jaune clair, pas de Gmelin, urée = 6 gr. 405. — 23 et 24 janv., inj. de 5 ctg., urine jaune clair, bien portant. — 25 et 26 janv., inj. de 5 ctg. — 27 janv., inj. de 6 ctg., urine jaune clair. — 28 janv., urine jaune foncé, peu d'albumine, pas de Gmelin, chien toujours bien portant, a peu maigri, inj. de 6 ctg. — 31 janv., inj. de 10 ctg. par kg. — 1^{er} fév., urine brunâtre très foncée, la réact. de Gmelin n'est pas nette. — 6 fév., inj. de 10 ctg. par kg. dans le péritoine. — 8 fév., le chien n'a pas mangé, urine peu colorée, pas ictérique, inj. de 11 ctg. par kg. dans le péritoine. — 11 fév., le chien est en très mauvais état, il ne mange plus, il est d'une grande maigreur, très anémique, on lui fait une dernière injection de 7 ctg. 5 par kg. Le chlorhydrate de toluylène-diamine dont nous nous servons aujourd'hui est de préparation récente, il est blanc,

sa solution est incolore. Quelques heures après l'injection le chien est pris de vomissements répétés, de phénomènes de péritonisme. Il meurt dans la nuit. Nous nous demandons si le nouveau produit employé, que nous venons à peine de recevoir, n'était pas, grâce à sa fraîcheur, d'une toxicité plus grande que celui que nous utilisions depuis le début et qui avait pris, bien que peu exposé à la lumière, une légère coloration grisâtre. L'impossibilité dans laquelle nous nous trouvions de faire le lavage du foie par l'eau salée nous fait donner pour le foie un chiffre qui représente, outre le fer du tissu hépatique, celui qui est contenu dans le sang sous forme d'hémoglobine. Nous n'avons pu également, à cause de l'état cadavérique, prélever de petits morceaux des organes pour l'examen histologique. Mais dans les dissociations fraîches du foie et de la rate, nous avons trouvé au microscope une grande quantité de grains de rubigine nettement formés. Nous avons fait trois dosages de fer dans le foie et dans la rate. La moyenne nous a donné pour le foie 0,58 et pour la rate 0,85.

Ce chien a reçu dans l'espace de 10 semaines : 13 inj. de 1 ctg. par kg., 8 de 2 ctg., 4 de 3 ctg., 9 de 4 ctg., 5 de 5 ctg., 2 de 6 ctg., 1 de 7 ctg., 5; 2 de 10 ctg. et 1 de 11 ctg., soit 45 inj. et 13 gr. 72 en tout. Poids du foie = 370 gr., poids de la rate = 55 gr.

Expérience 2. — Chienne de 10 kg. 300. — 9 déc., inj. s./cut. de 1 ctg. par kg. de chlorhydrate de toluylène-diamine en solution à 1/50 dans une solution de NaCl à 8‰. — 10 déc., 12, 13, 14, 15, 16, 17 déc., inj. de 1 ctg. par kg. — 19 déc., pas d'ictère manifeste, mange assez bien, inj. de 2 ctg. par kg. — 20 déc., 21, 22, 23, 24 déc., inj. de 2 ctg. par kg., mange très peu depuis quelques jours. — 26 et 27 déc., inj. de 2 ctg. par kg. — 28 déc., l'ictère n'apparaît toujours pas nettement, inj. de 3 ctg. par kg.; a encore très peu mangé et est restée abattue quelques jours après cette injection. — 6, 7 et 9 janv., inj. de 3 ctg. par kg. — 10 janv., pas d'ictère marqué aux sclérotiques, mange mieux, ne semble pas très malade, nous augmentons la dose, inj. de 4 ctg. par kg. — 11 janv., inj. de 4 ctg. par kg.

— 12 et 13 janv., toujours pas d'ictère prononcé, état satisfaisant. La chienne a donc reçu dans l'espace de 5 semaines : 8 inj. de 1 ctg., 8 de 2 ctg., 4 de 3 ctg., 2 de 4 ctg. ; soit 22 inj. et 46 ctg. par kg. et 4 gr. 83 de toluylène en tout. — 14 janv., la chienne est sacrifiée par piqûre du bulbe et section des carotides.

A l'autopsie, l'ictère des organes est peu marqué, la vésicule biliaire non distendue, les voies biliaires perméables. Le foie est lavé en faisant passer par la veine porte 9 litres de solution salée à 7,5 ‰. Le foie après lavage, examiné avec le tableau chromatique de Broca, donne une nuance intermédiaire à 37 et 43. Le foie pèse 305 gr., la rate 50 gr. Sur des dissociations des tissus, on trouve au microscope beaucoup de grains de pigment ocre bien formés dans le foie, la rate, la moelle des os. Ce pigment traité par le sulfhydrate d'ammoniaque se colore en noir. Après un séjour de 23 heures dans l'étuve à 110°, le foie donne comme poids sec 18,02 ‰ et la rate 28 ‰. De petits morceaux de foie, rate, pancréas, rein, cœur, ganglions abdominaux et moelle des os (fémur) sont fixés immédiatement dans le Lindsay et le Zenker pour l'examen histologique. La moelle des os est molle, diffluyente, brunâtre, il est très difficile de la recueillir en bon état, elle est comme en bouillie et diffère énormément comme consistance de la moelle saine. La recherche de l'isotonie par le procédé indiqué plus haut avec du sang prélevé avant de sacrifier l'animal ne donne aucune modification de la résistance. La sol. saline à 5,8 ‰ est légèrement colorée ; la sol. à 6 ‰ reste incolore.

3 dosages de fer sont faits dans le foie et 2 dans la rate, avec le colorimètre de Duboscq. Nous obtenons en moyenne, pour 1 gr. de foie = 0 mg. 46, et pour 1 gr. de rate = 1 mg. 11. Voici le détail de ces dosages :

Notre étalon correspond à la division 50 du colorimètre.

1^{er} dosage du fer dans le foie. — 5 gr. de foie donnent au colorimètre la division 22, d'où $50 : 22 = 2$ mg. 27 de fer dans 5 gr. de foie, d'où pour 1 gr., $2,27 : 5 = 0$ mg. 45 de fer.

2^e dosage. — 5 gr. de foie donnent la division 21, d'où $50 : 21 = 2,38$ qui divisé par 5 = 0 mg. 47.

3^e dosage. — 3 gr. de foie donnent la division 31, d'où $50 : 31 = 1,61$ et le quotient : $3 = 0,47$.

1^{er} dosage de fer dans la rate. — 2 gr. 50 de tissu frais donnent la division 18, donc $50 : 18 = 2$ mg. 77 de fer pour 2 gr. 50 de rate, et pour 1 gr. on a $2,77 : 2,5 = 1$ mg. 10.

2^e dosage. — 2 gr. de rate = division 22, d'où $50 : 22$ et le quotient : $2 = 1$ mg. 13 de fer.

Sur des préparations histologiques non colorées et montées avec la gelée à la glycérine on voit des grains de rubigine nombreux dans la moelle des os, le foie, la rate.

Dans le foie le pigment est situé dans le tissu conjonctif, autour des vaisseaux et dans l'endothélium vasculaire. Les cellules hépatiques sont petites, atrophiées, leurs limites sont effacées, leurs noyaux se colorent faiblement, il y a de petites gouttelettes de graisse dans les cellules. Dans la rate, la rubigine est répandue dans tout l'organe, les cellules sont altérées.

On ne trouve pas de pigment ferrugineux dans le rein. Les canaux urinaires contiennent des produits de desquamation de l'épithélium. Il y a une légère dégénérescence grasseuse des cellules et pas d'augmentation du tissu conjonctif. Les épithéliums sont malades, les limites des cellules sont en certains endroits bien conservées et en d'autres disparues; les noyaux se colorent assez facilement. Le pancréas et le cœur semblent normaux.

Dans l'expérience suivante, nous cherchons le degré de toxicité de notre toluyène-diamine.

Expérience 3. — Petit caniche de 4 kg. — 16 déc., inj. de 5 ctg. de chlorhydrate de toluyène-diamine par kg. dans le péritoine (sol. à 1/50). — 17 déc., inj. de 5 ctg. par kg. dans le péritoine, recherche de l'isotonie avec du sang pris dans la saphène. Au bout de 24 heures on trouve une diffusion nette de l'hémoglobine dans les solutions 40, 45, où le spectroscope montre 2 larges raies d'oxyhémoglobine, faible dans les solutions 50, 55 et 60, et nulle dans les solutions suivantes, où le liquide est absolument incolore. — 19 déc., chien assez mal portant, n'a pas mangé depuis 24 heures, est couché dans sa cage, très abattu, on ne peut avoir d'urine. L'ictère n'est pas

très intense aux sclérotiques. Inj. de 10 ctg. par kg. dans le péritoine. — 20 déc., le chien est mort dans la nuit. La dernière dose était trop forte. A l'autopsie, tous les organes abdominaux, l'épiploon, le péritoine, sont d'une coloration ictérique très intense; la vésicule biliaire est distendue par la bile qui est vert noirâtre, visqueuse, épaisse. Le foie est rouge foncé, très riche en sang, la rate de couleur rouge noir, le rein très congestionné, sa capsule s'enlève facilement; tout le tube digestif renferme des matières colorées par la bile, la région de l'ampoule duodénale est très fortement colorée en jaune, les voies biliaires sont perméables. La vessie distendue contient une urine rouge brunâtre qui à l'examen spectroscopique donne les 2 raies de l'oxyhémoglobine.

Expérience 4. — Chien épagneul de 21 kg. — 16 janv., inj. s./cut. de 3 ctg. par kg. de chlorhydrate de toluylène-diamine. — 17 janv., même injection. — 18 janv., chien malade, a très peu mangé, sclérotiques légèrement ictériques, inj. de 3 ctg. par kg. — 19 janv., très abattu, ne mange pas, inj. de 3 ctg. par kg. — 20 janv., même état, inj. de 3 ctg. par kg. — 21, 23 et 24 janv., est mieux portant, urine brun foncé, pas de réaction de Gmelin nette, inj. de 3 ctg. par kg. — 25 janv., inj. de 3 ctg. par kg., urine brun foncé, pas de réaction de Gmelin nette, urée = 30,74 par litre. — 26, 27, 28 janv., inj. de 3 ctg. par kg. — 31 janv., inj. de 5 ctg. par kg. — 4 fév., le chien est sacrifié par piqûre du bulbe et section des carotides. La coloration du sang n'est pas modifiée. Le foie est lavé, il conserve après le lavage une teinte assez foncée. La vésicule n'est pas distendue par la bile. Les organes abdominaux n'ont pas de coloration ictérique sensible. Des petits morceaux des organes sont fixés dans le Lindsay et le Zenker. La moelle des os (fémur) s'enlève facilement, n'est pas trop diffluente, coloration jaune brun. Poids du foie = 620 gr. Poids de la rate = 75 gr. Sur des dissociations de foie et de rate on voit au microscope un grand nombre de grains de rubigine.

3 dosages de fer sont faits dans le foie et 2 dans la rate. Ils

donnent comme moyenne pour le foie = 0,68 et pour la rate = 1,60 en milligrammes par gramme de tissu frais.

Ce chien a reçu 11 inj. de 3 ctg. et 1 inj. de 5 ctg. par kg., soit en 12 inj. 38 ctg. par kg. et en tout 6 gr. 51 de chlorhydrate de toluylène-diamine. Quelques injections faites avec des solutions trop concentrées ne se sont pas résorbées, la collection liquide a dû être ponctionnée à cause de la vive irritation causée et des menaces d'ulcération.

Sur des préparations histologiques on voit dans le foie des grains de rubigine dans le tissu conjonctif et autour des vaisseaux. Les cellules ne sont pas très altérées, les noyaux se colorent assez bien. Il n'y a pas de dégénérescence graisseuse.

Il y a également beaucoup de rubigine dans la rate; elle est disséminée dans tout l'organe. Beaucoup de cellules sont atrophiées.

Il n'y a pas de pigment dans le rein. Les noyaux se colorent très faiblement. Il n'y a pas de graisse dans les cellules épithéliales des canaux urinifères et pas d'augmentation du tissu conjonctif. Les cellules sont très altérées, leurs limites ne se voient pas nettement, elles sont en partie tombées dans la lumière des canaux. Le pancréas et le cœur semblent normaux.

Expérience 5. — Chien de 21 kg. — 16 janv., inj. sous-cutanée de 5 ctg. de chlor. de toluyl.-diam. par kg. — 17 janv., chien malade, reste couché dans sa cage, n'a pris aucune nourriture depuis hier, inj. de 5 ctg. par kg. — 18 janv., nous ne lui faisons pas d'injection, il est trop souffrant, a très peu mangé et a eu des vomissements, conjonctives un peu colorées. — 19 janv., il est encore très malade, dort toujours et ne prend pas de nourriture. On veut le faire marcher, il se traîne difficilement. Les quelques gouttes d'urine que l'on recueille sont fortement colorées en rouge et on y voit des globules sanguins au microscope; il a de l'hémoglobinurie. — 20 janv., il ne nous semble pas encore assez rétabli pour recevoir une nouvelle injection. — 21, 23 janv., il se remet de jour en jour, mange un peu, est très amaigri. — 24 janv., il est presque rétabli, nous diminuons la

dose et faisons une injection de 3 ctg. — 26 janv., il est de nouveau un peu malade, inj. de 3 ctg. par kg. — 27 janv., inj. de 3 ctg. par kg., mauvais état, toujours maigre. — 28 janv., urine jaune foncé, pas de Gmelin net ni d'albumine. — 31 janv., inj. de 5 ctg. par kg., chien très maigre mais encore vigoureux. — 6 fév., inj. de 5 ctg. par kg. dans le péritoine. — 11 fév., inj. de 7 ctg. par kg. dans le péritoine (avec le même chlorhydrate de préparation récente), mort dans la nuit après des vomissements répétés.

Cette circonstance nous empêche encore de faire le lavage du foie, il faudra donc en tenir compte dans le chiffre fourni par le dosage du fer du foie. Poids du foie = 545 gr. Poids de la rate = 62 gr.

Ce chien a reçu 4 inj. de 3 ctg., 3 de 3 ctg. et 1 de 7 ctg. par kil., soit 8 inj. et 36 ctg. par kg., et a eu, comme le chien précédent, quelques injections qui ne se sont pas résorbées et ont dû être évacuées par ponction.

3 dosages du fer dans le foie et la rate donnent en moyenne pour le foie 0,74 et pour la rate 1,15.

L'examen microscopique de dissociations du foie et de la rate montre beaucoup de grains de rubigine.

Expérience 6. — Chien de 11 kg. — 8 fév., inj. intra-péritonéale de 5 ctg. par kg. de chlorhydrate de toluyl.-diam. — 10 et 11 fév., conjonctives subictériques, hémoglobinurie. — 11 fév., inj. intra-péritonéale de 5 ctg. par kg. avec un produit préparé depuis peu et très blanc. Chien trouvé mort le lendemain après des vomissements répétés. Impossibilité de faire le lavage du foie.

Poids du foie 545 gr., poids de la rate 80 gr.

3 dosages de fer dans le foie et la rate, moyenne pour le foie = 0,39, pour la rate = 0,85.

Expérience 7. — Chienne de 13 kg. — 8 fév., inj. intra-péritonéale de 5 ctg. par kg. de notre chlorhydrate. — 10 et 11 fév., conjonctives subictériques, hémoglobinurie. — 11 fév.,

inj. intra-péritonéale de 5 ctg. par kg. avec une préparation de toluylène-diamine que nous venons de recevoir au laboratoire ; chienne trouvée morte le lendemain après des vomissements. On ne peut faire le lavage du foie. Poids du foie = 345 gr., de la rate = 70 gr. 3 dosages du fer dans le foie et la rate, moyenne pour le foie = 0, 40, pour la rate = 0,70.

Expérience 8. — 17 nov. Chien de 16 kg. — On place une canule dans l'artère humérale, on prend une petite quantité de sang, qui est reçue par moitié dans deux tubes renfermant déjà quelques centimètres cubes d'une solution dans l'eau distillée de NaCl 10 et oxalate de soude 6 ‰. Cette solution est hyperisotonique et oxalatée en même temps, pour empêcher la coagulation du sang. On agite légèrement les deux tubes, puis ils sont immédiatement centrifugés. On ne constate pas au spectroscopé d'hémoglobine diffusée dans la solution, qui reste incolore. — A 3 h. 50 on injecte dans le péritoine du chien 0 gr. 05 par kg. de chlorhydrate de toluylène-diamine en solution dans l'eau distillée. 35 minutes après, on fait une nouvelle prise de sang, on le recueille dans deux tubes comme précédemment. Après centrifugation, on ne trouve pas d'hémoglobine diffusée.

Expérience 9. — 26 nov. Chien de 14 kg. — Prise de sang dans l'artère fémorale, on le reçoit comme dans l'expérience précédente dans la même solution chlorurée et oxalatée. Après centrifugation, on ne trouve pas d'hémoglobine. — A 3 h. 50, inj. de 5 ctg. par kg. dans le péritoine. 3 prises de sang sont faites 1/2 h., 1 h. et 1 h. 1/2 après l'injection. Le sang est traité comme précédemment et, après centrifugation, on ne voit pas d'hémoglobine dissoute dans la solution.

Expérience 10. — 22 déc. Chien de 11 kg. — A 1 h. 35, inj. de 10 ctg. par kg. de chlorhydrate de toluylène-diamine dans le péritoine. Une canule est placée dans l'artère fémorale

et 8 prises de sang sont faites, 3/4 d'heure, 1 h. 1/4, 1 h. 3/4, 2 h. 1/4, 2 h. 3/4, 3 h. 1/4, 3 h. 3/4 et 4 h. 1/4 après l'injection. Le sang est reçu dans la même solution hyperisotonique que dans les précédentes expériences. Jamais on ne peut constater la présence d'hémoglobine après centrifugation. Le liquide reste toujours incolore. Des gouttes de sang recueillies 2 h. 3/4, 3 h. 1/4, 3 h. 3/4 et 4 h. 1/4 après l'injection sont utilisées pour la recherche de l'isotonie. Au bout de 24 heures les tubes des 4 séries ainsi faites présentent la même coloration pour les solutions correspondantes. Dans les 4 séries les solutions 40 et 45 sont colorées en rose et donnent au spectroscope les 2 raies de l'oxyhémoglobine, les solutions 50 et 53 sont faiblement teintées, et les solutions à partir de 60 sont absolument incolores. C'est ce qui se voit en somme à la normale.

23 déc. L'état du chien est très mauvais. Son urine est très foncée, brunâtre, on n'y trouve pas de pigments biliaires ni d'hémoglobine au spectroscope. Le chien est sacrifié ; quelques morceaux de ses organes sont conservés pour l'histologie, et on n'y découvre rien d'anormal.

Expérience 11. — 2 fév. Chien de 9 kg. — Inj. dans le péritoine de 0,13 par kg. de chlorh. de toluyl. Nous prenons 3 séries de tubes renfermant 5 cmc. des sol. de NaCl à 50, 54, 58, 62, 66 et 70 ‰. Dans la 1^{re} série nous laissons tomber dans chaque tube 1 goutte de sang pris à l'oreille du chien avant l'injection ; les 2 autres séries sont faites de même avec du sang pris à l'autre oreille 2 h. 1/2 après l'injection. Ce dernier sang a une teinte plus foncée. — 24 heures après, nos trois séries de tubes nous donnent le même résultat ; les sol. 50, 54 et 58 renferment de l'hémoglobine (plasma coloré avec affaiblissement progressif de la teinte et raies d'hémoglobine au spectroscope), les sol. 62, 66 et 70 sont absolument incolores. Plusieurs essais de dosage colorimétrique de l'hémoglobine dissoute dans des solutions hypoisotoniques sont faits ; nous en parlerons plus loin.

3 fév. Chien très malade. Prise de sang de l'artère fémorale. Ce sang est brun noir. On voit déjà cette coloration après

la découverte de l'artère à travers les tuniques du vaisseau. Examiné au spectroscope après dilution avec de l'eau distillée, on voit à une faible épaisseur les 2 raies de l'oxyhémoglobine, et à une plus grande épaisseur une 3^e raie dans le rouge, la raie de la méthémoglobine très nette, augmentant avec l'épaisseur, et située entre les divisions 40 et 45 du micromètre. Nouvel essai de dosage de l'hémoglobine dissoute dans des solutions hypoisotoniques.

L'animal est sacrifié par piqûre du bulbe et section des carotides. Après l'incision abdominale, le foie paraît rouge foncé, mais une canule est fixée dans la veine porte, on fait le lavage du foie, qui se décolore beaucoup et donne au tableau chromatique une nuance assez pâle. Il était donc très riche en sang. Poids du foie 320 gr. La rate renferme également beaucoup de sang ; poids de la rate 30 gr. La vésicule biliaire est distendue par la bile, son contenu est vert foncé, visqueux, épais.

La vessie est distendue par l'urine. Celle-ci est recueillie par pression sur l'organe et a une coloration brun rouge. Diluée et filtrée, elle est examinée au spectroscope et renferme beaucoup d'hémoglobine et un peu de méthémoglobine.

La moelle des os est jaune brunâtre, très fragile. Les tissus sous-cutanés, les viscères abdominaux, les séreuses, le contenu intestinal présentent une coloration ictérique. De petits morceaux des principaux organes sont fixés dans le Zenker pour l'examen histologique. On n'y voit pas de modifications importantes.

2 dosages de fer sont faits dans le foie et la rate. La moyenne donne pour le foie = 0,092 et pour la rate 0,46.

Expérience 12. — 20 déc. — Nous recherchons l'action de la toluylène-diamine sur le sang in vitro. Dans 9 éprouvettes nous mettons 5 cmc. de la sol. hypertonique de NaCl à 6,5 ‰. La première éprouvette reçoit 2 gouttes de la solution de chlorhyd. de toluyl. à 1/50 dans l'eau distillée, et les suivantes 4, 6, 8. . . . et 18 gouttes. Nous laissons enfin tomber 3 gouttes de sang de chien normal. Après dépôt des globules, les solutions ont une coloration jaune brunâtre, produite uniquement par la

solution de toluylène-diamine qui n'était pas incolore, car on ne voit au spectroscope aucune bande d'absorption.

Expérience 13. — 9 janv. — 10 éprouvettes sont remplies de 5 cmc. des sol. de NaCl de 0,46 à 0,64 ‰ par 0,02 ‰ avec 1 goutte de sang. Après dépôt le liquide des premières éprouvettes jusqu'à 0,58 compris renferme de l'hémoglobine ; à partir de 0,60 toutes les solutions sont incolores. Nous avons fait 3 expériences analogues le 12, le 14 et le 31 janvier avec du sang de chien normal (2 gouttes) ; elles donnent les mêmes résultats. C'est entre 0,58 et 0,60 que s'arrête la diffusion de l'hémoglobine.

Ces recherches de la résistance minima des globules rouges ont été suivies d'un certain nombre d'expériences in vitro destinées à apprécier les modifications de la résistance globulaire sous l'effet du chlorhydrate de cocaïne ; nous ne parlerons pas de ces dernières.

Nous reproduisons maintenant quelques-unes de nos expériences préliminaires se rapportant à la détermination au colorimètre de l'hémoglobine dissoute dans des solutions salines. On y verra les tâtonnements, les causes d'erreurs et les modifications successives apportées au procédé que nous avons décrit plus haut.

Expérience 14. — 26 déc. — Nous prenons 80 cmc. d'une solution de NaCl à 4 ‰, nous y introduisons 2 cmc. de sang de chien normal, mesurés simplement au moyen de la seringue de Strauss de 2 cmc. Après agitation, on centrifuge. Le plasma examiné au colorimètre donne le nombre 42. Le mélange complet, plasma et globules, après addition de quelques gouttes d'éther et agitation pour dissoudre toute l'hémoglobine, donne au colorimètre la division 37. Le rapport de l'hémoglobine dissoute à l'hémoglobine totale des globules est donc $\frac{37}{42} = 88 \text{ ‰}$. Une grande partie de l'hémoglobine s'était donc dissoute.

Expérience 15. — 12 janv. — Dans 40 cme. de chacune des solutions de NaCl à 48, 50, 52, 54 et 56 ‰, on verse 1 cme. de sang normal. Agitation. Après centrifugation les 3 dernières solutions ne sont pas limpides, l'appareil à centrifuger à main étant mal réglé. Nous obtenons comme rapport pour la solution 48 = 63 ‰ d'hémoglobine dissoute et pour la solution 50 = 58 ‰.

Nous faisons 3 nouveaux essais de colorimétrie les 14, 17 et 19 janvier avec 50 cme. de diverses solutions de NaCl et 2 cme. de sang, mais sans résultats. Dans un cas, le sang s'écoulant trop lentement par une canule étroite, nous avons des caillots ; dans un autre nous en avons également, la mesure du sang étant faite au moyen d'une pipette graduée en verre, ce qui demande beaucoup trop de temps si on veut la faire avec précision et exige chaque fois un changement de pipette ou le nettoyage de l'instrument. Dans le 3^e cas nous n'avons pas songé, après dissolution par l'éther de tous les globules, à diluer la solution dont l'intensité de coloration ne permettait pas une lecture précise.

Expérience 16. — Nous prenons 25 cme. des solutions de NaCl à 38, 42, 46 et 50 ‰ et 2 cme. de sang mesurés avec la seringue de Strauss. Agitation et centrifugation. Les solutions sont d'autant plus colorées et le dépôt globulaire d'autant moins volumineux qu'on s'approche de la solution 38. Le plasma de chaque solution est examiné au colorimètre, puis le liquide total est dilué d'une égale quantité d'eau pour dissoudre les globules et rendre la lecture plus facile. Le chiffre obtenu en 2^e lecture est divisé par 2 à cause de la dilution.

On obtient les rapports suivants :

Solution 38	= 95 ‰ d'hémoglob. dissoute	
— 42	= 88	—
— 46	= 71	—
— 50	= 25	—

3 nouveaux essais de dosage colorimétrique sont faits les 31 janvier, 1^{er} et 2 février avec 10 cmc. des sol. de NaCl à 38, 42, 46 et 50 ‰ et 1 cmc. de sang. Mais des caillots s'étant encore formés dans quelques tubes, nous n'avions pas assez de déterminations précises pour l'établissement d'une courbe. Nous nous décidons alors à oxalater légèrement nos solutions pour empêcher la coagulation. Mais nous voulons que le mélange de chlorure et d'oxalate de sodium ne modifie pas le pouvoir isotonique de nos précédentes solutions.

Admettant comme de Vries que 2 solutions isotoniques de sels différents contiennent des quantités de sels proportionnelles à leurs poids moléculaires, nous trouvons qu'il y a isotonie entre les solutions de NaCl à 0,585 et d'oxalate de soude à 1,34 ‰, parce que leurs poids moléculaires sont respectivement 58,5 et 134. D'où on déduit qu'une molécule d'oxalate de soude = 2,29 molécules de NaCl.

Et ainsi on établit qu'une solution de NaCl à 5 gr. ‰ est isotonique à une solution d'oxalate à $5 \times 2,29 = 11,45$ gr. ‰.

De la même façon on trouve que :

la solution de NaCl à 4,6 ‰	=	la solution de $C_2O_4Na_2$ à 10,53 ‰
— 4,2	=	— 9,61
— 3,8	=	— 8,70
— 3,4	=	— 7,78
— 3	=	— 6,87
— 2,6	=	— 5,95

Nous avons préparé une seule solution d'oxalate de soude à 11,45 ‰ correspondant exactement comme pouvoir isotonique à la solution 50 de NaCl, et nous l'avons plus ou moins diluée pour obtenir les autres. Comme il suffit largement de 2 ‰ d'oxalate pour empêcher la coagulation du sang, nous en avons mis cette proportion dans nos nouvelles solutions.

Mais nous aurions pu sans inconvénient mettre un volume égal des 2 solutions chlorurée et oxalatée de même pouvoir isotonique.

Les solutions dont nous nous sommes servi pour la plus grande partie de nos examens colorimétriques ont été faites en

assez grande quantité de façon à n'en pas changer et ont la composition suivante :

la sol. 50 a 500 ^{ème} de NaCl à 5,0 ‰ et 500 ^{ème} de C ₂ O ₄ Na ₂ à 11,45 ‰				et 4 ^{ème} d'eau	
— 46	—	4,6	— 46	—	8 —
— 42	—	4,2	— 42	—	12 —
— 38	—	3,8	— 38	—	16 —
— 34	—	3,4	— 34	—	20 —
— 30	—	3	— 30	—	24 —
— 26	—	2,6	— 26	—	—

Expérience 17. — Nous prenons 10 cmc. des solutions chlorurées et oxalatées précédentes 38, 42, 46 et 50 et 1 cmc. de sang. Pour la 2^e lecture on dilue par une égale quantité d'eau distillée. On obtient les rapports suivants :

Solution 38	=	31 ‰	d'hémoglob. dissoute
— 42	=	13	—
— 46	=	7	—
— 50	=	indosable	—

2 séries de tubes pour la recherche de l'isotonie avec 2 gouttes de sang montrent, après dépôt, de l'hémoglobine dans les solutions 50, 54, 58 ; les solutions 62, 66 et 70 restent incolores.

Expérience 18. — 20 fév. Jeune chienne, moins d'un an, 6 kg. 700. — On lui prend du sang par l'artère fémorale. Ce sang sert à préparer une série d'éprouvettes pour l'isotonie (50 à 70) avec 2 gouttes dans chaque, et une série de solutions chlorurées oxalatées pour l'examen colorimétrique, avec 1 cmc. de sang pour 10 des solutions 38, 42, 46 et 50. Aussitôt après, injection sous-cutanée de 6 ctg. par kg. de chlorh. de toluy.

Après centrifugation, les lectures au colorimètre donnent :

la solution 38	=	10 ‰	d'hémoglobine dissoute ;
— les solutions 42, 46 et 50	=	indosables	

2 h. 1/4 après l'injection, une nouvelle prise de sang est faite ; ce sang donne au dosage colorimétrique le même chiffre

pour 38, les solutions 42, 46 et 50 sont encore indosables. Une nouvelle série d'éprouvettes à isotonie est préparée. Il n'y a aucune modification appréciable dans le sang, coloration identique à celle du sang normal.

21 fév. — Les 2 séries de solutions pour la recherche de l'isotonie, faites hier avec le sang recueilli avant et 2 h. 1/4 après l'injection, donnent les mêmes résultats ; il n'y a aucune différence. Il y a diffusion nette dans les solutions 50 et 54, faible dans 58 et nulle dans les autres.

24 heures après l'injection une nouvelle prise de sang est faite. On prépare une série de tubes à isotonie et une série de tubes à dosage (nos 26 à 50 avec 1 cmc. de sang pour 10 de sol.). Après dépôt des globules on voit de l'hémoglobine dissoute dans les solutions 50, 54, 58, 62, 66 et 70 des petites éprouvettes. Il est vrai que notre chienne a de l'hémoglobinhémie. En effet 3 tubes renfermant notre sol. hyperisotonique habituelle (NaCl et $C^2 O^4 Na^2$) reçoivent chacun 1 cmc. de ce sang, sont centrifugés et on constate, ce que nous n'avions jamais trouvé, en opérant il est vrai quelques heures seulement après l'injection, la présence d'hémoglobine dissoute dans ces solutions ; la coloration rosée est même assez prononcée, bien qu'il n'y ait que 1 cmc. de sang et le spectroscope montre les 2 bandes extrêmement nettes de l'oxyhémoglobine en leur place habituelle. Les chiffres trouvés au dosage sont assez élevés :

Solution	26 = 66 % d'hémoglob. dissoute	
—	30 = 53	—
—	34 = 47	—
—	38 = 37	—
—	42 = 31	—
—	46 = 26	—
—	50 = 23	—

Le sang recueilli est rouge, légèrement brunâtre. Au spectroscope, après dilution, nous trouvons les 2 bandes de l'oxyhémoglobine et à une assez forte épaisseur une mince raie dans le rouge ; il y a donc une légère trace de méthémoglobine.

L'examen de ce sang au microscope montre des globules moins colorés, d'autres altérés et en voie de régénération ; des

granulations se voient au milieu du plasma, d'autres sont encore adhérentes aux globules par un appendice grêle ; on le voit bien en faisant varier la vis micrométrique.

Expérience 19. — 24 fév. Chien de 10 kg. 200. — On lui prend du sang, puis on lui fait une injection intra-péritonéale de 8 ctg. par kg. de chlorh. de toluyl. Avec ce sang, on établit comme d'habitude une série de tubes pour l'isotonie et une pour le dosage de l'hémoglobine (de 26 à 50) avec 4 cmc. de sang dans chaque pour 10 cmc. de solution.

Le dosage donne comme résultats :

Solution 26	=	76	% d'hémoglob. dissoute
— 30	=	66	—
— 34	=	43	—
— 38	=	22	—
— 42	=	10	—
— 46	=	indos.	
— 50	=	indos.	

La recherche de l'isotonie montre de l'hémoglobine dans les solutions 50, 54 et 58 ; la solution 62 est la première incolore.

25 fév. Le chien d'hier a succombé, la dose avait été trop forte.

Expérience 20. — 27 fév. Vieux chien de 8 kg., aveugle, très maigre, mauvais état. — On lui prend du sang et on prépare comme d'habitude 2 séries de solutions pour la recherche de l'isotonie et le dosage de l'hémoglobine, puis inj. de 5 ctg. par kg. de chlor. de toluyl.

Le sang normal donne le tableau suivant :

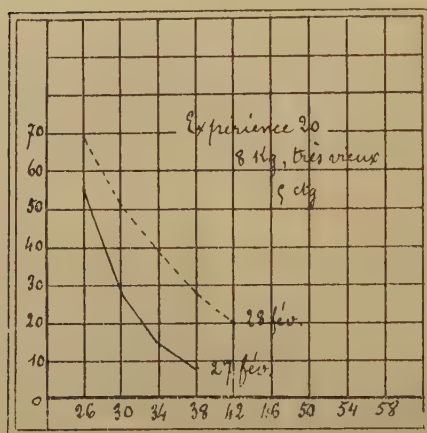
Solution 26	=	55	% d'hémoglob. dissoute
— 30	=	28	—
— 34	=	15	—
— 38	=	8	—
— 42	=	indos.	
— 46	=	indos.	
— 50	=	indos.	

Les éprouvettes pour la recherche de l'isotonie montrent la diffusion de l'hémoglobine dans les solutions 50, 54 et 58 ; les solutions suivantes restent incolores.

28 fév. Le chien est en si mauvais état au moment où nous arrivons au laboratoire, que nous lui prenons immédiatement du sang par la carotide. Ce sang est de couleur brun noir. 1 cmc. de sang versé dans 10 cmc. de la solution hyperisotonique montre, après centrifugation, une coloration rosée et les deux bandes de l'oxyhémoglobine au spectroscope. La teinte foncée du sang se voit déjà par transparence à travers les parois de l'artère. Le sang renferme de la méthémoglobine.

Le tableau suivant est obtenu par le dosage au colorimètre :

Solution 26	= 69	% d'hémoglob. dissoute
— 30	= 51	—
— 34	= 39	—
— 38	= 28	—
— 42	= 20	—



Il y avait des caillots dans 46 et 50, le sang coulant alors très lentement pendant l'asphyxie. Une série d'éprouvettes de 50 à 80, pour la recherche de l'isotonie, ayant reçu 2 gouttes de ce sang, on voit de l'hémoglobine dans tous les tubes.

Expérience 21. — 1^{er} mars. Chien de 8 kg. très bien portant, gras, 2 ans. — On lui prend du sang à l'artère fémorale, on en met 2 gouttes dans une série de petites éprouvettes pour l'isotonie et on prépare une série des solutions habituelles pour le dosage de l'hémoglobine ; on fait alors une injection sous-cutanée de 3 ctg. par kg. de chlorh. de toluy. Après dépôt, les 3 éprouvettes 50, 54 et 58 sont seules colorées ; les solutions 62, 66 et 70 restent incolores.

Les résultats du dosage au colorimètre sont les suivants :

Solution	26	=	76	% d'hémoglob. dissoute
—	30	=	66	—
—	34	=	42	—
—	38	=	27	—
—	42	=	14	—
—	46	=	7	—
—	50	=	indos.	—

2 mars. Le chien est bien portant, n'a nullement l'air malade. On lui reprend du sang de l'artère fémorale et on prépare une série de tubes pour l'isotonie et pour le dosage de l'hémoglobine. Le mandrin de la canule étant tombé, il se produit une assez forte hémorrhagie. Le sang est très légèrement brunâtre. Après centrifugation, l'examen au spectroscope des diverses solutions sous une épaisseur de 2 cm. montre une raie très étroite dans le rouge (méthémoglobine), mais elle ne se voit que dans les solutions où la diffusion de l'hémoglobine est la plus intense et où le spectre de l'oxyhémoglobine est constitué par une seule large bande qui couvre l'espace séparant primitivement les 2 bandes isolées d'oxyhémoglobine. Il y a donc une très légère quantité de méthémoglobine.

Le dosage colorimétrique donne comme rapports :

Solution	26	=	63	% d'hémoglob. dissoute
—	30	=	52	—
—	34	=	33	—
—	38	=	17	—
—	42	=	8	—
—	46	=	indos.	—
—	50	=	indos.	—

Ces chiffres sont un peu inférieurs aux précédents. D'ailleurs cela se prévoyait à première vue avant de faire les lectures ; 2 solutions y sont indosables. Si maintenant nous cherchons le résultat de l'isotonie, nous voyons qu'il n'y a d'hémoglobine diffusée nettement que dans les solutions 50 et 54 ; dans la solution 58, c'est très douteux ; les solutions suivantes sont absolument incolores.

Nous avons préparé également 2 mélanges de 1 cmc. de sang et 10 cmc. de la solution hypertonique ; après centrifugation, nous n'avons pas trouvé de coloration rosée du plasma, pas de bandes au spectroscope. Notre chien n'avait donc pas d'hémoglobinhémie.

17 mars. Ce chien, qui est au repos depuis 15 jours, s'est très bien rétabli ; après avoir été quelques jours malade, il mange bien, est en excellent état ; il a ses ligatures des fémorales et la plaie est presque refermée. On lui prend du sang par la carotide, puis on lui fait une injection sous-cutanée de 3 ctg. par kg. de chlor. de toluyll. ; nous employons dorénavant la toluylène-diamine fraîchement préparée et incolore.

Le dosage de l'hémoglobine diffusée donne les chiffres :

Solution	26	=	37	% d'hémoglob. dissoute
—	30	=	21	—
—	34	=	9	—
—	38	=	6	—
—	42	=	indos.	
—	46	=	indos.	
—	50	=	plasma incolore	

21 heures après cette injection, une nouvelle prise de sang est faite ; ce sang a une couleur légèrement brunâtre, chocolat ; il sert à faire nos mélanges pour l'examen colorimétrique. Après centrifugation, on examine les divers plasmas directement dans les tubes au spectroscope, donc sous une épaisseur de 2 cm. Les plasmas 50 et 46 ne donnent que les bandes de l'oxyhémoglobine, la raie de la méthémoglobine apparaît dans le 42 et augmente d'épaisseur dans les tubes 38 et 34, où on voit encore bien séparées les bandes de l'oxyhémoglobine. Une solution oxalatée hyperisotonique avec 2 cmc. de sang ne montre

pas après centrifugation d'hémoglobine dissoute dans le plasma. Il n'y a donc pas d'hémoglobinhémie.

Une solution de sang dans l'eau distillée examinée au spectroscope montre à une faible épaisseur le spectre de l'oxyhémoglobine; à une épaisseur plus forte on voit en outre apparaître la bande de la méthémoglobine dans le rouge. Cette solution est filtrée et placée dans un tube de même diamètre (2 cm.) que ceux qui nous servent pour les dosages, puis comparée au spectroscope à celui de nos mélanges de sang et de solution saline qui après centrifugation présente une coloration identique. On y voit le même spectre, raie de méthémoglobine dans le rouge et 2 bandes d'oxyhémoglobine d'épaisseur à peu près égales dans les 2 solutions. Le chien est sacrifié et on fait le lavage de son foie.

Résultats du dosage de l'hémoglobine avec le dernier sang :

Solution	26	=	42	% d'hémoglob. dissoute
—	30	=	30	—
—	34	=	21	—
—	38	=	16	—
—	42	=	13	—
—	46	=	8	—
—	50	=	5	—

Dosages du fer. Il y a eu deux dosages pour le foie et deux pour la rate. — Moyenne : pour le foie = 0,19 ; pour la rate = 0,84. — Poids du foie = 360 gr. Poids de la rate = 37 gr.

Expérience 22. — 3 mars. Chien de 10 kg. 200, jeune et vigoureux. — On lui prend juste assez de sang pour faire deux séries de tubes pour le dosage de l'hémoglobine. Ces deux séries donnent les mêmes résultats, puis inject. sous-cutanée de 6 ctg. par kg. de chlorhydrate de toluyl.-diam.

Nous obtenons comme dosage les chiffres suivants :

Solution 26	= 81	% d'hémoglob. dissoute
— 30	= 68	—
— 34	= 50	—
— 38	= 34	—
— 42	= 18	—
— 46	= 8	—
— 50	= indos.	—

L'isotonie donne la diffusion nette avec les solutions 50, 54, 58, nulle avec les suivantes.

4 mars. Le chien est trouvé en très mauvais état. Il meurt dans la journée, 2 heures après la prise de sang. Le sang, dès l'incision, paraît brun noir. Avec lui on fait une série de mélanges pour le dosage colorimétrique et on prépare une série de tubes pour l'isotonie, et un tube avec 1 cmc. de sang et 10 cmc. de la solution hyperisotonique. Au spectroscope, on trouve de l'hémoglobine dans le plasma de la solution hyperisotonique. Il y a donc hémoglobinhémie. Dans les autres plasmas, il y a de la méthémoglobine en grande quantité.

Les éprouvettes pour la recherche de l'isotonie contiennent de l'hémoglobine dissoute dans toutes nos solutions 50, 54, 58, 62, 66, 70.

Le dosage de l'hémoglobine fournit les rapports suivants :

Solution 26	= 91	% d'hémoglob. dissoute
— 30	= 79	—
— 34	= 67	—
— 38	= 55	—
— 42	= 47	—
— 46	= 39	—
— 50	= 32	—

Expérience 23. — 6 mars. Jeune chien de 7 kg., un an.
— Prise de sang, mélange comme d'habitude avec nos solutions pour le dosage. Inj. sous-cutanée de 4 ctg. par kg. de chlorhydrate de toluylène-diamine.

Nous obtenons comme résultats :

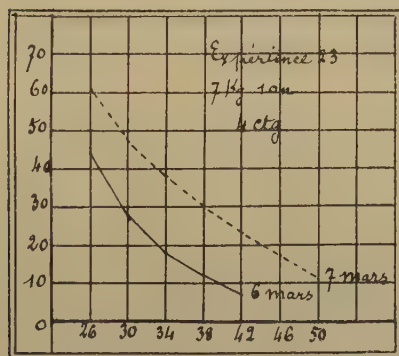
Solution 26	= 44	% d'hémoglob. dissoute
— 30	= 28	—
— 34	= 18	—
— 38	= 12	—
— 42	= 7	—
— 46	= indos.	
— 50	= indos.	

7 mars. Chien très malade ; il meurt dans la soirée.

Prise de sang 24 heures après l'injection. 1 cmc. de sang dans 10 cmc. de la solution hyperisotonique ; après centrifugation le spectroscope fait apparaître dans le plasma deux bandes très étroites d'oxyhémoglobine, donc légère hémoglobinhémie. Sang de coloration brune. On en met 1 cmc. dans chacune des solutions destinées au dosage. Le plasma de ces solutions centrifugées renferme de l'hémoglobine et de la méthémoglobine.

Le dosage de l'hémoglobine dissoute dans le plasma de nos solutions nous fournit comme résultats :

Solution 26	= 61	% d'hémoglob. dissoute
— 30	= 47	—
— 34	= 38	—
— 38	= 30	—
— 42	= 23	—
— 46	= 17	—
— 50	= 11	—



Expérience 24. — 8 mars. Dans un verre gradué renfermant 0,20 d'oxalate de soude, nous recevons 100 cmc. de sang d'un chien normal. Nous agitions pour empêcher la coagulation. 15 cmc. de ce sang sont versés dans un 1^{er} tube. Une égale quantité est introduite dans un 2^e tube, renfermant 0 gr. 025 de chlorhyd. de toluyl., dans un 3^e avec 0 gr. 05, dans un 4^e avec 0,075 et dans un 5^e avec 0,10 de chlorhyd. de toluyl. La toluylène-diamine que nous utilisons est de préparation récente et absolument blanche. Elle est bien réduite en poudre. Les 5 tubes sont agités modérément jusqu'à ce que la dissolution soit complète, ce qui se fait facilement. On centrifuge et on examine au spectroscope. Dans le 1^{er} tube, qui contient du sang normal, on ne voit aucun spectre. Le plasma du 2^e tube montre les deux raies de l'oxyhémoglobine à leur place habituelle et une raie très étroite dans le rouge. Dans le 3^e tube, les trois bandes se voient encore, mais un peu plus larges. Dans les tubes 4 et 5, les deux raies de l'oxyhémoglobine se sont rapprochées de façon à ne former qu'un seul spectre très large, et la bande existe toujours dans le rouge très marquée. Si l'on décante le plasma de ces deux derniers tubes, ils redonnent après dilution les trois bandes nettement séparées. Le plasma des différents tubes était d'autant plus coloré que la quantité de toluylène-diamine ajoutée était plus forte.

Expérience 25. — 10 mars. Chien de 8 kg. très vieux (une douzaine d'années). — La plupart de ses dents sont tombées, yeux très mauvais, depuis quelques jours au chenil, assez bon état.

A midi on lui prend une petite quantité de sang par l'artère fémorale. Des tubes contenant 10 cmc. de nos solutions titrées chlorurées et oxalatées de 26 à 50 reçoivent chacun 1 cmc. de ce sang. Ces tubes sont agités pour empêcher la coagulation et portés immédiatement à la centrifuge. A midi 40 injection sous-cutanée de 3 ctg. par kg. de chlorhyd. de toluylène-diamine.

5 heures après, une nouvelle prise de sang est faite, il n'a pas tout à fait la coloration du sang normal, il paraît un peu brunâtre. Une 2^e série de tubes renfermant les mêmes sol. et 1 cmc.

de sang est faite et centrifugée. 1 cmc. de ce même sang est mélangé à 10 cmc. de notre sol. hyperisotonique et, après centrifugation, le plasma de ce dernier tube est absolument incolore.

Le lendemain 11 mars, 26 heures après l'injection, on prend de nouveau du sang qui sert à préparer une 3^e série de tubes comme les deux précédentes. 1 cmc. est aussi versé dans 10 cmc. de notre solution hyperisotonique, pour rechercher s'il y a de l'hémoglobinhémie, et après centrifugation, le plasma décanté paraît presque incolore; néanmoins, au spectroscope, il semble qu'on y distingue les deux bandes extrêmement étroites et pâles de l'oxyhémoglobine.

Le 14 mars, 4 jours après l'injection, ce chien est repris. Il a peu mangé depuis, est très maigre, en mauvais état. Les saignées faites jusqu'ici ont fait perdre peu de sang au chien. Il en a été pris juste assez pour les dosages. Il a une double ligature des fémorales, on lui prend du sang par la carotide. Ce sang est d'une belle couleur rouge. Il nous sert à faire une 4^e série de tubes comme les précédentes.

Examinons maintenant le résultat des dosages au colorimètre dans nos 4 séries.

Le plasma obtenu avec la série du sang normal est extrêmement peu coloré, 3 tubes sont indosables, nous obtenons les chiffres suivants :

Solution	26	=	45	% d'hémoglob.,	dissoute
—	30	=	23	—	
—	34	=	10	—	
—	38	=	6	—	
—	42	=	indos.		
—	46	=	indos.		
—	50	=	indos.		

Le sang recueilli 5 heures après l'injection, dont la coloration était un peu brunâtre, devait contenir déjà un peu de méthémoglobine, mais il n'y avait pas, comme nous l'avons vu, hémoglobinhémie. Il donne le tableau suivant :

Solution	26	=	51	% d'hémoglob. dissoute
—	30	=	30	—
—	34	=	12	—
—	38	=	perdu	—
—	42	=	3	—
—	46	=	indos.	—
—	50	=	indos.	—

On remarque dans ces deux séries un fort dépôt de globules au fond des tubes après centrifugation, même avec la solution 26, à l'inverse de ce qui se produit dans plusieurs de nos expériences précédentes, où presque toute l'hémoglobine est dissoute et où le dépôt ne semble formé que de stromas ou de fibrine. On voit déjà d'après le tableau l'effet de la toluylène-diamine 5 heures après l'injection.

Le plasma de la 3^e série, renfermant le sang recueilli 26 heures après l'injection, est examiné au spectroscope. On trouve dans tous les tubes, même dans le dernier n^o 50, la bande de la méthémoglobine ; les deux raies de l'oxyhémoglobine sont séparées dans les solutions 46 et 50 ; dans les solutions moins concentrées les deux raies se sont rapprochées en un spectre unique ; il faudrait diluer pour les voir de nouveau séparées. Nous obtenons le tableau suivant après dosage :

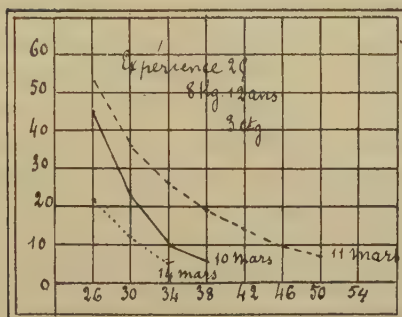
Solution	26	=	53	% d'hémoglob. dissoute
—	30	=	36	—
—	34	=	26	—
—	38	=	19	—
—	42	=	14	—
—	46	=	10	—
—	50	=	7	—

Tous les tubes sont dosables, comme nous le voyons ; la courbe remonte ; la fragilité des globules est donc beaucoup plus grande. En outre, s'il y a un très léger degré d'hémoglobinhémie, nous avons vu que cette hémoglobine qui serait dissoute dans le sang circulant serait à l'état de trace indosable et ne pourrait ajouter son influence.

Le plasma des tubes de la 4^e série (4 jours après l'injection) est tellement peu teinté qu'on ne peut prendre pour la lecture au colorimètre une solution d'hémoglobine de la couleur de

notre étalon à hémoglobine. Nous prenons donc une solution très faiblement colorée. 3 tubes seulement sont dosables et la teinte va en décroissant régulièrement jusqu'au dernier qui est à peine coloré. Nous obtenons le tableau suivant :

Solution 26	= 22 % d'hémoglob. dissoute	
— 30	= 12	—
— 34	= 5	—
— 38	= indos.	
— 42	= indos.	
— 46	= indos.	
— 50	= indos.	



Expérience 26. — 13 mars. Chienne de 8 kg., 3 ans, en très bon état, très grasse. — A midi, prise de sang par l'artère fémorale et dosage de l'hémoglobine diffusée dans nos solutions de 26 à 50 (1 cmc. de sang pour 10 de solution). A midi 30, injection de 3 ctg. par kg. de chlorhydrate de toluyène-diamine. A 6 heures, 5 h. 1/2 après l'injection, nouvelle prise de sang et préparation d'une 2^e série de tubes comme la précédente.

14 mars. 26 heures après l'injection, on prend de nouveau du sang par l'autre artère fémorale et 3^e série de tubes (26 à 50); on verse de même 2 cmc. de ce sang dans 10 cmc. de la solution hyperisotonique. La chienne a eu une forte hémoglobinurie et est morte dans la nuit.

Nos trois séries de tubes sont agités légèrement et centrifugés.

La 1^{re} série (sang normal) nous donne le tableau suivant :

Solution	26	=	76	% d'hémoglob. dissoute
—	30	=	57	—
—	34	=	42	—
—	38	=	32	—
—	42	=	18	—
—	46	=	7	—
—	50	=	indosable	

Nous remarquons immédiatement avant le dosage qu'il y a beaucoup d'hémoglobine diffusée dans le plasma. Toutes les solutions semblent dosables, la dernière seule n'a pu être comparée à la solution d'hémoglobine, de même nuance que notre étalon, qui nous avait servi pour les précédentes lectures. Nous aurions pu le faire cependant en diluant légèrement cette solution d'hémoglobine. Il y a donc une différence sensible entre la résistance des globules du sang de cette chienne et celle de l'expérience précédente. En outre le dépôt des globules au fond des premiers tubes est peu considérable, on voit surtout des stromas.

Le sang recueilli, 5 h. 1/2 après l'injection, dans la 2^e série de tubes, n'a pu nous servir pour l'examen au colorimètre ; nous avons oublié d'agiter les solutions immédiatement après l'introduction du sang ; nous ne l'avons fait qu'après la ligature et la suture de la plaie. Il était un peu tard ; de petits caillots s'étaient formés que l'agitation n'a pu dissoudre et que nous avons retrouvés après la centrifugation.

Ce même sang, après dilution avec de l'eau distillée, est examiné au spectroscopie. A une faible épaisseur, on voit les 2 raies de l'oxyhémoglobine en leur place habituelle. A une épaisseur plus grande, une 3^e bande paraît dans le rouge (méthémoglobine) et les 2 bandes de l'oxyhémoglobine augmentent de largeur et de coloration.

Il faut une solution assez concentrée pour voir la méthémoglobine ; il n'y en a donc pas une très grande quantité. Après avoir par quelques gouttes d'ammoniaque alcalinisé notre solution sanguine, nous voyons que la bande de la méthémoglobine qui se trouvait au milieu du rouge se déplace vers la droite, vers l'orangé et pâlit.

Les 2 bandes de la partie droite du spectre ne se modifient pas. Nous avons dans le 1^{er} cas, au milieu du rouge, la bande de la méthémoglobine en solution acide, et dans le 2^e la même en solution alcaline.

Le sang est légèrement brunâtre. En somme, après 5 h. 1/2, nous avons déjà trouvé de la méthémoglobine dans le sang circulant.

L'examen au colorimètre de notre 3^e série de tubes (26 heures après l'injection) nous donne les résultats suivants :

Solution 26	= 78	% d'hémoglob. dissoute
— 30	= 65	—
— 34	= 52	—
— 38	= 40	—
— 42	= 34	—
— 46	= 24	—
— 50	= 19	—

Le sang est brunâtre, nuance chocolat. Tous les plasmas de nos divers tubes sont dosables et il y a un certain relèvement de la courbe. La solution hyperisotonique oxalatée, qui renfermait 2 cmc. de sang, est centrifugée. Le plasma est coloré. Il donne sous l'épaisseur du diamètre du tube (2 cm.) au spectroscopie 2 bandes très nettes occupant la place de celles de l'oxyhémoglobine, et aucune bande dans le rouge. La chienne avait donc de l'hémoglobinhémie. Elle a eu d'ailleurs, nous l'avons dit déjà, de l'hémoglobinurie. Le plasma du tube 50 examiné au spectroscopie donne les 2 bandes de l'oxyhémoglobine et la bande de la méthémoglobine.

2 séries de petites éprouvettes sont préparées pour la recherche de l'isotonie avec 2 gouttes de sang normal et de sang recueilli 26 heures après l'injection. Dans la première série, les solutions 50, 54 et 58 contiennent de l'hémoglobine ; dans la seconde, tous nos tubes en contiennent 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74 et 78. Nous avons vu d'ailleurs qu'il y avait de l'hémoglobinhémie.

Expérience 27. — 15 mars. Chienne de 6 kg., 6 à 7 ans.
— A midi prise de sang par l'artère fémorale. Une première série des solutions (26-50) est préparée comme d'habitude avec le sang pour l'examen colorimétrique. A midi 40, injection de 4 ctg. par kg. de chlorhyd. de toluyl.

5 heures 1/2 après l'injection on prend de nouveau du sang et une deuxième série de solutions est faite avec ce sang. En outre 2 cmc. de sang sont mélangés à 10 cmc. de notre solution hyperisotonique et après centrifugation on ne trouve pas d'hémoglobine dissoute.

16 mars. 24 heures après l'injection, nouvelle prise de sang, qui n'a pas la coloration normale, mais n'est que légèrement brunâtre. On fait une série de tubes pour le dosage, comme d'habitude. Ce sang dilué est examiné au spectroscope. Sous une faible épaisseur, on voit les 2 bandes de l'oxyhémoglobine. En augmentant progressivement l'épaisseur, les 2 bandes deviennent plus larges, puis se réunissent; il n'y a pas encore de raie dans le rouge. Ce n'est que sous une épaisseur beaucoup plus considérable qu'une faible raie de méthémoglobine apparaît dans le rouge. Au contraire, si immédiatement après centrifugation nous portons au spectroscope notre tube 50, c'est-à-dire celui de notre série dont la solution saline est la plus concentrée, nous trouvons 2 bandes correspondant à celles de l'oxyhémoglobine et une raie assez large dans le rouge (méthémoglobine). Nous sommes donc amené à nous poser l'hypothèse suivante: la méthémoglobine se dissout-elle dans les solutions salées plus facilement que dans l'eau distillée, ou dans ces solutions la méthémoglobine diffuse-t-elle avant la matière colorante normale des globules? Il semblerait alors que les globules chargés de méthémoglobine se détruiraient d'abord et seraient les premiers pris par les organes hématopoïétiques pour la fabrication du pigment.

Dans la solution 46 la bande de méthémoglobine est encore plus marquée, ainsi que celles de l'oxyhémoglobine.

L'examen au colorimètre de nos trois séries de solutions donne pour le dosage les résultats suivants :

Sang normal :

Solution	26	=	52	% d'hémoglob. dissoute
—	30	=	36	—
—	34	=	21	—
—	38	=	11	—
—	42	=	5	—
—	46	=	indos.	
—	50	=	indos.	

Le sang recueilli 5 heures 1/2 après l'injection donne des chiffres à peu près analogues, il y a donc à ce moment une modification très légère. Le sang pris 24 heures après l'injection fournit les résultats suivants :

Solution	26	=	66	% d'hémoglob. dissoute
—	30	=	48	—
—	34	=	30	—
—	38	=	21	—
—	42	=	13	—
—	46	=	12	—
—	50	=	10	—

En outre, 2 cmc. de ce sang-recueilli 24 heures après l'injection étant mélangés à 10 cmc. de notre solution hyperisotonique, le plasma a après centrifugation une légère teinte rosée, donnant les 2 bandes de l'oxyhémoglobine. La chienne avait donc de l'hémoglobinhémie.

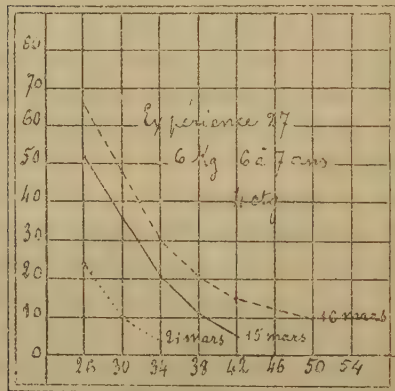
Ce même sang est examiné au microscope. Nous faisons des préparations de sang frais (on laisse tomber 1 goutte dans environ 10 cmc. de sérum de Hayem et agitation immédiate) et de sang desséché. A un fort grossissement, nous trouvons des globules décolorés, des globules en train d'émettre des granulations ; ces granulations très colorées leur sont encore adhérentes ou sont disséminées dans le plasma ; il y a de nombreux globules déformés en voie de destruction, quelques-uns sont comme framboisés, d'autres sont divisés comme en croix en 4 parties prêtes à se séparer ; leur forme et leur grandeur sont très variables. On trouve aussi des hématies incolores, visibles parce qu'elles écartent les autres globules ; ce sont les corpuscules invisibles, les achromacytes d'Hayem. Les globules blancs sont en plus grand nombre.

Comme comparaison, 2 séries de petites éprouvettes sont

préparées pour l'isotonie avec le sang normal et le sang recueilli 24 heures après l'injection. Dans la première série, les solutions 50, 54 et 58 seules renferment de l'hémoglobine après repos de 24 heures. Dans la 2^e série on en trouve aussi dans les solutions 62, 66, 70, 74 et 78.

21 mars. Notre petite chienne, qui s'est rétablie progressivement depuis une semaine environ et mange bien, est reprise aujourd'hui pour l'examen de son sang. La carotide est découverte et chacun des tubes d'une nouvelle série de nos solutions reçoit 1 cmc. de sang. Après centrifugation, l'examen au colorimètre donne les résultats suivants :

Solution 26	= 24	% d'hémoglob. dissoute
— 30	= 10	—
— 34	= 4	—
— 38	= indos.	
— 42	= indos.	
— 46	= indos.	
— 50	= indos.	



En comparant ce tableau à ceux des 15 et 16 mars, on voit que la quantité d'hémoglobine dissoute est considérablement diminuée. Le sang est dans sa période de réparation, avec des globules jeunes, plus résistants. La coloration de nos solutions forme une belle échelle de teintes. Le dernier plasma est absolument incolore. Le n° 46 est très légèrement teinté. Toutes les solutions à partir du n° 38 sont indosables.

Expérience 28. — 17 mars. Jeune chienne de l'année, 10 kg., grande, n'ayant pas atteint sa taille. — A 2 heures prise de sang par la fémorale. A 3 heures injection sous-cutanée de 3 ctg. par kg. de chlorhyd. de toluy. Une série de solutions oxalatées reçoit 1 cmc. de sang normal. Après centrifugation nous obtenons comme résultats à l'examen colorimétrique :

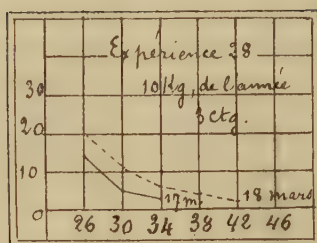
Solution 26	= 14 % d'hémoglob. dissoute	
— 30	= 5	—
— 34	= 2,6	—
— 38	= indos.	
— 42	= indos.	
— 46	= indos.	
— 50	= indos.	

Nous voyons de nouveau que les globules des tout jeunes chiens sont extrêmement résistants pour les solutions salées. Les 4 dernières solutions sont absolument indosables. La teinte rosée y est extrêmement faible. Quant au n° 50, le plasma y est absolument incolore.

18 mars. 22 heures après l'injection, le sang s'écoule avec une nuance brun chocolat. La chienne est assez malade. 1 cmc. de sang est mélangé aux solutions salines destinées au dosage ; après centrifugation, le plasma est examiné au spectroscope sous l'épaisseur du diamètre de nos tubes (2 cm.) ; dans les 6 derniers tubes, on voit distinctement les 2 bandes de l'oxyhémoglobine, le plasma y est partout coloré. Dans le n° 26 seul, on voit, en outre du spectre de l'oxyhémoglobine, la bande de la méthémoglobine dans le rouge. La coloration du plasma est faible dans les solutions 46 et 50 et indosable. 2 cmc. de sang mélangés à 10 cmc. de la sol. hyperisotonique ne laissent diffuser aucune trace d'hémoglobine. Il n'y a pas d'hémoglobinhémie.

Nous obtenons le tableau suivant :

Solution 26	= 20 % d'hémoglob. dissoute	
— 30	= 11	—
— 34	= 6	—
— 38	= 4	—
— 42	= 2	—
— 46	= indos.	
— 50	= indos.	



22 mars. Nous examinons de nouveau le sang de la chienne qui se repose depuis 4 jours ; la solution 26 nous donne comme résultat 0,10. Le n° 30 aurait été dosable, mais il est renversé ; les n°s 34 et 38 sont absolument indosables. Nous sommes encore arrivés à la période de rénovation du sang.

Nous terminons cette expérience par un nouvel examen de l'action de la toluylène-diamine *in vitro* sur le sang. Une certaine quantité de sang de notre chienne est agitée avec 1/1000^e d'oxalate de soude pour empêcher la coagulation. On en prend 100 cmc. qu'on mélange avec 25 ctg. de chlorhydrate de toluyl. incolore et bien en poudre. On laisse au contact un certain temps, puis on centrifuge. Le plasma a une légère coloration rose brunâtre et est transparent. Examiné au spectroscope, on voit à une faible épaisseur les 2 bandes de l'oxyhémoglobine. Ces 2 bandes augmentent de largeur avec l'épaisseur. A une épaisseur très grande, on voit apparaître une faible raie dans le rouge, et les bandes de l'oxyhémoglobine ont conservé leur situation. La raie dans le rouge augmente de dimension en augmentant encore un peu l'épaisseur. Après addition de quelques gouttes d'ammoniaque et agitation, on examine de nouveau. On ne voit plus la raie dans le rouge, elle ne s'est pas déplacée vers la droite. Il ne reste plus que les 2 bandes de l'oxyhémoglobine. La raie dans le rouge était déjà très faible, elle a pâli et a disparu.

Expérience 29. — 20 mars. Chien de 1 an 1/2 environ, poids 6 kg. — 1 cmc. de sang dans chacune de nos solutions pour le dosage, puis injection sous-cutanée de 3 ctg. par kg. de toluylène-diamine.

Les lectures au colorimètre nous donnent les résultats suivants pour le sang normal :

Solution 26	= 41	% d'hémoglob.	dissoute
— 30	= 20		—
— 34	= 7		—
— 38	= 5		—
— 42	= 2		—
— 46	= indos.		
— 50	= indos.		

C'est encore un chien jeune, ses globules sont assez résistants.

24 heures après l'injection, nouvelle prise de sang, qui est rouge brunâtre, avec méthémoglobine. 5 cmc. de ce sang sont mélangés à 5 cmc. de notre solution hyperisotonique oxalatée et centrifugés. On trouve au spectroscope 2 bandes extrêmement minces et à peine marquées répondant à celles de l'oxyhémoglobine ; donc très légère hémoglobinhémie ; plasma très légèrement coloré. Une série de tubes sont préparés comme d'habitude avec 1 cmc. de sang et nous avons le tableau suivant :

Solution 26	= 52	% d'hémoglob.	dissoute
— 30	= 25		—
— 34	= 12		—
— 38	= 8		—
— 42	= 5		—
— 46	= 2,8		—
— 50	= indos.		

Il y a encore un léger relèvement de la courbe.

Expérience 30. — 23 mars. Grand chien, très robuste, 23 kg., 2 à 3 ans. — Nous faisons nos mélanges de sang normal avec les solutions oxalatées habituelles, puis injection sous-cutanée de 3 ctg. par kg. de chlorhyd. de toluyl..

L'examen au colorimètre de cette série de solutions donne :

Solution	26 = 59	% d'hémoglob. dissoute
—	30 = 37	—
—	34 = 17	—
—	38 = 11	—
—	42 = 6	—
—	46 = indos.	
—	50 = indos.	

24 mars. 24 heures après, nouvelle prise de sang. Il est d'une couleur rouge clair normale, différente de celle que nous avons d'habitude au bout de 24 heures avec nos petits chiens. Il n'est pas question ici de teinte brunâtre chocolat. On se doute que ce sang ne doit pas contenir de méthémoglobine. En effet, nous prenons diverses solutions de ce sang dans l'eau distillée, et nous les examinons au spectroscope. A une faible épaisseur, nous avons les deux bandes d'oxyhémoglobine ; en augmentant d'épaisseur, ces deux bandes augmentent de netteté, de coloration et de largeur. Enfin elles finissent par se réunir et on n'a plus qu'une large bande noire. Dans aucun cas, en prenant une solution plus concentrée, sous des épaisseurs variables, on ne peut voir la raie de la méthémoglobine. Donc ce sang ne renferme pas la plus petite trace de méthémoglobine. Nous faisons avec ce sang une série de solutions pour le dosage de l'hémoglobine. Après centrifugation, nous examinons les divers plasmas au spectroscope. A première vue, on voit que le plasma n'est pas plus coloré que la veille, peut-être même moins. Une solution hyperisotonique oxalatée avec 5 cmc. de sang reste absolument incolore, il n'y a donc pas d'hémoglobinhémie. Le plasma n° 50, qui est très faiblement coloré, donne deux bandes d'oxyhémoglobine très étroites. Ces deux bandes s'élargissent dans les solutions moins riches en sel, enfin dans les deux premières solutions les deux bandes n'en font plus qu'une ; mais on ne voit nulle part trace de méthémoglobine.

Les chiffres que nous obtenons sont un peu moins forts que ceux du sang normal.

Solution	26	=	56	% d'hémoglob. dissoute
—	30	=	31	—
—	34	=	12	—
—	38	=	6	—
—	42	=	4	—
—	46	=	indos.	
—	50	=	indos.	

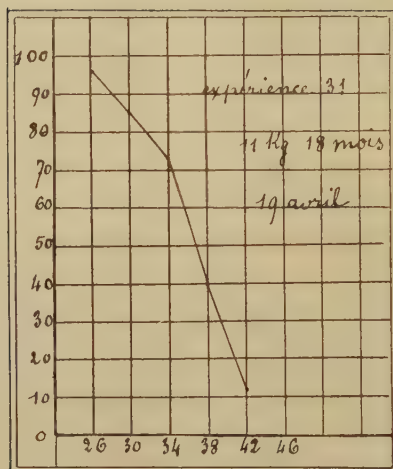
Notre chien ne paraît pas malade, alors que nos petits chiens étaient fortement abattus. Il a eu seulement un peu de diarrhée. A égalité de dose par kg., notre substance n'a donc pas produit le même effet chez ce grand chien adulte que chez les petits chiens que nous prenions habituellement. Il semble donc que la présence de méthémoglobine annonce un degré d'altération de plus des globules et une moindre résistance des globules à céder leur matière colorante. Elle joue peut-être même un rôle dans ce phénomène.

Deux séries d'éprouvettes pour la recherche de l'isotonie contenant, l'une 2 gouttes de sang normal, l'autre 2 gouttes de sang pris 24 heures après l'injection, sont examinées après le dépôt des globules. Dans les deux séries on voit la diffusion de l'hémoglobine dans les solutions 50, 54 et 58. A partir de 62, les solutions sont absolument incolores. Il n'y a aucune différence entre les deux séries. Il n'est donc pas étonnant qu'on ne trouve pas, par l'examen colorimétrique avec le sang examiné 24 heures après l'injection, une plus grande quantité d'hémoglobine dissoute qu'avec le sang normal.

Expérience 31. — 19 avril. Chien de 11 kg., bien portant, 18 mois environ, très vigoureux. — 1 cmc. de sang dans 10 cmc. de chacune de nos nouvelles solutions de NaCl et d'oxalate de potassium dont nous avons parlé plus haut et que nous employons pour la 1^{re} fois, puis injection sous-cutanée de 5 ctg. par kg. de chlorhyd. de toluy.

Le dosage avec le sang normal après centrifugation donne comme résultats :

Solution	26	=	96	% d'hémoglob. dissoute
—	30	=	85	—
—	34	=	73	—
—	38	=	40	—
—	42	=	12	—
—	46	=	renversé	
—	50	=	indos.	



20 avril. Le chien n'a nullement l'air malade, il a assez bien mangé.

22 heures après l'injection, prise de sang. Il semble avoir la coloration normale. Quelques gouttes sont dissoutes dans l'eau distillée. A l'examen spectroscopique, on voit les deux bandes de l'oxyhémoglobine. A une épaisseur beaucoup plus grande, il y a absorption de toute la partie droite du spectre, on ne voit pas de raie de méthémoglobine dans le rouge. Mais si on prend une solution qui contient plus de sang, on voit en même temps qu'une absorption complète du spectre une raie très étroite dans le rouge. Il y a donc une trace de méthémoglobine.

L'examen de ce sang au colorimètre après introduction à 1/10 dans les mêmes solutions de NaCl et d'oxalate de potassium donne :

Solution 26	=	93	% d'hémoglob. dissoute
— 30	=	83	—
— 34	=	71	—
— 38	=	37	—
— 42	=	11	—
— 46	=	indos.	
— 50	=	indos.	

La sol. hypertonique ne montre pas d'hémoglobine dissoute.

21 avril. Chien ne paraît toujours pas malade. Le sang a une coloration normale.

En solution dans l'eau distillée, on voit au spectroscope le spectre de l'oxyhémoglobine et à une très grande épaisseur, alors que depuis longtemps toute la partie du spectre est absorbée, on aperçoit comme hier une raie très étroite dans le rouge.

Le dosage au colorimètre donne comme résultats :

Solution	26	=	92	% d'hémoglob.	dissoute
—	30	=	82		—
—	34	=	63		—
—	38	=	31		—
—	42	=	9		—
—	46	=	indos.		
—	50	=	indos.		

Pas d'hémoglobine dissoute dans la solution hypertonique.

CONCLUSIONS

I. — Le chlorhydrate de toluylène-diamine, administré aux chiens par la voie sous-cutanée, produit à la dose de 2 à 6 ctg. par kg. une intoxication caractérisée par de l'abattement, de l'inappétence, de l'ictère et souvent de l'hémoglobinurie. Ces phénomènes n'apparaissent que lentement et mettent plusieurs jours à disparaître. L'examen microscopique du sang révèle avec les plus fortes de ces doses une altération du globule rouge *in vivo*.

Ces symptômes ont été observés par différents auteurs et nous les avons simplement vérifiés. Nous avons retrouvé également les mêmes constatations à l'autopsie et à l'examen de nos préparations histologiques.

II. — Le fer provenant de la destruction globulaire s'accumule sous forme de rubigine dans le foie, la rate et la moelle des os. La teneur en fer augmente surtout dans le foie (vérification des expériences de Lapicque et Meunier).

III. — Les petites doses (1 ctg. de chlorhydrate par kg.) ne produisent aucun phénomène toxique appréciable de l'extérieur. Elles peuvent être répétées impunément chaque jour pendant plusieurs semaines. Non seulement les effets ne s'additionnent pas, mais l'animal semble même devenu réfractaire aux doses qui produisent d'emblée une forte intoxication chez les sujets neufs.

Cette conclusion relative aux doses est applicable aux

altérations hématiques et organiques dont nous allons nous occuper.

IV. — Il y a une assez grande irrégularité dans la susceptibilité des chiens à l'action toxique de la toluylène-diamine. Avec une dose moyenne de 3 ctg. par kg. par ex., un chien sera assez fortement intoxiqué, alors qu'un autre paraîtra à peine s'en ressentir. Nous n'avons pu préciser exactement les conditions de ces différences. Il nous a semblé pourtant que les animaux très jeunes ou très vieux étaient plus susceptibles que les sujets adultes et vigoureux.

V. — La dissolution des globules rouges dans le sang circulant, qui a été admise par les auteurs comme l'effet primordial de la toluylène-diamine et comme le mécanisme essentiel de l'action toxique de cet agent, n'a lieu qu'avec des doses déjà élevées et encore en minime proportion, comme nous nous en sommes assuré en cherchant l'hémoglobine dissoute dans le plasma. Cette quantité est beaucoup trop petite pour pouvoir représenter le taux de l'hématolyse accusée par l'ictère et surtout par le dépôt de fer dans les organes.

VI. — On peut étudier d'une façon précise, au moyen de la colorimétrie, la façon dont les globules rouges se comportent dans une série de solutions salines de concentration moléculaire décroissante à partir de la solution dite isotonique. L'action destructive de chacune de ces solutions sur les globules est exprimée par le rapport de l'hémoglobine mise en liberté à l'hémoglobine totale introduite sous forme de globules rouges. La résistance globulaire pour une solution donnée est évidemment d'autant plus faible que la proportion d'hémoglobine dissoute est plus grande.

VII. — En appliquant cette méthode à un même animal comparativement avant l'injection de toluylène-

diamine et 24 heures après cette injection, nous avons dans la plupart des cas constaté une augmentation marquée de l'hémoglobine dissoute, c'est-à-dire une diminution de la résistance du sang.

Si on fait la même recherche au bout de quelques jours sur un animal qui a survécu, on trouve alors non plus une diminution, mais une augmentation nette de la résistance du sang. Ce phénomène n'est pas spécial à la toluyène-diamine, il a déjà été observé par d'autres méthodes après la saignée ; il indique ici la réparation de l'anémie causée par le poison.

Pour pouvoir affirmer avec certitude qu'il s'agit d'une diminution de la résistance des globules rouges, il faudrait s'être assuré que l'hyperisotonie du sérum, qui intervient dans nos expériences d'une façon non négligeable, n'a pas varié. Nous n'avons pas fait cette détermination ; mais les écarts observés dans la résistance du sang sont assez considérables pour qu'il soit presque impossible de les attribuer à une diminution de l'isotonie du sérum. D'ailleurs, le rapprochement avec les faits ci-dessus, encore plus avec celui qui suit, indique bien une altération globulaire.

VIII. — Dans les conditions où nous avons observé cette diminution de résistance globulaire, nous avons toujours observé la présence de méthémoglobine dans le sang. Les deux phénomènes, altérabilité globulaire et altération de la matière colorante, sont absolument corrélatifs, c'est-à-dire que les variations d'intensité de l'un et de l'autre nous ont toujours paru se produire dans le même sens, qu'il s'agisse de doses différentes, ou de résistance différente des sujets.

IX. — La portion de matière colorante diffusée dans les solutions hypoisotoniques ne paraît pas contenir une proportion de méthémoglobine plus forte que la portion restée dans le dépôt globulaire.

X. — Le mécanisme fondamental de l'intoxication par la toluyène-diamine nous paraît, en résumé, consister beaucoup moins en une destruction des globules dans le sang circulant qu'en une altération de ces globules portant sur leur résistance et sur leur matière colorante, altération qui provoque vraisemblablement la destruction de ces globules par les organes hématolytiques et spécialement par le foie.

Vu :

Le Président de la thèse,
CHARLES RICHEL.

Vu :

Le Doyen,
P. BROUARDEL.

Vu et permis d'imprimer :

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,
GRÉARD.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Accorimboni.** — Potere isotonico del sangue negli stati morbosi. Congresso medico di Roma nel 1892.
2. **Afanassiew.** — Zeitschrift für klinische Medicin, tome 6. 1883.
3. — Archiv für pathol. Anat. und Phys., tome 98. 1884.
4. **Agostini.** — Isotonia del sangue negli alienati. Riv. pen. di freniatria, 1892.
5. **Arthus.** — Eléments de chimie physiologique, 1897.
6. **Bianchi-Mariotti.** — Prodotti solubili di microrganismi e potere isotonico del sangue. Wiener med. Presse, settembre 1894.
7. — L'isotonia del sangue nelle infezioni sperimentali. Gazz. degli Ospedali, aprile 1895.
8. **Bottazzi.** — La resistenza dei globuli rossi del sangue di animali operati di tiroidectomia. Sperimentale 1894.
9. — La milza come organo emocatatonistico. Sperimentale 1894.
10. — Accademia medica fiorentina. 10 giugno 1895.
11. **Bousquet.** — Recherches cryoscopiques sur le sérum sanguin. La plasmolyse et l'isotonie chez les êtres vivants. Thèse Paris 1899.
12. **Camus et Gley.** — Recherches sur l'action physiologique du sérum d'anguille. Contribution à l'étude de l'immunité naturelle et acquise. Arch. de pharmacodynamie 1898.
13. **Castellino.** — Gazz. degli Ospedali (4 gennaio 1891, 11, 18, 22 marzo, 1 aprile, 1 luglio 1891).
14. — Sul trattamento delle anemie da emolisi col sublimato corrosivo. Morgagni, giugno 1894).

15. **Cavazzani.** — Il sublimato e la resistenza del sangue. *Riforma medica*, novembre 1891.
16. **Chanel.** — Recherches sur la résistance des hématies. Thèse Lyon 1880.
17. **Chwostek.** — Über das Wesen der paroxysmalen Hämoglobinurie. Leipzig 1894.
18. **Cutore.** — Azione della chinina sull' isotonia, ecc. *Riforma medica* 1895.
19. — Azione della chinina sull' isotonia. *Policl.* marzo 1896.
20. **Domenici.** — Isotonia del sangue in seguito all' estirpazione della milza. *Gazz. degli Ospedali*, maggio 1895.
21. **De Dominicis.** — Supplemento al *Policlinico*, 31 agosto 1895.
22. **Ehrlich.** — *Charité Annalen*, 1885.
23. **Engel et Kiener.** — Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences 1887.
24. **Eykman.** — Über die Permeabilität der Blutkörperchen. *Arch. für die ges. Physiol.* 1897.
25. **Féré.** — *Soc. de Biologie*, 16 mars 1889.
26. **Fulloni.** — Sulla resistenza del sangue. Milano, *il Morgagni* 1897.
27. **Gallerani.** — Résistance de l'hémoglobine dans le jeûne. *Annal. di Chim. e di Farmacol.* XVI. 1893.
28. — Résistance de l'hémoglobine dans le jeûne. Milan 1892, *Ann. di chimica* XXI.
29. — Résistance de la combinaison entre l'hémoglobine et le stroma globulaire dans le jeûne. *Arch. ital. de biologie*, tome XVIII. 1893.
30. **Gangitano.** — Ricerche ematologiche nell' immunizzazione difterica. *Policlinico*, décembre 1895.
31. **Gley et Langlois.** — Résistance des globules rouges du sang chez les lapins thyroïdectomisés, *Soc. de Biologie*, 1895.
32. **Grijns.** — Über den Einfluss gelöster Stoffe auf die rothen Blutzellen in Verbindung mit den Erscheinungen der Osmose und Diffusion. *Arch. f. das ges. Physiol.* LXIII, 1896.
33. **Hall.** — Über das Verhalten des Eisens im thierischen Organismus. *Arch. für Anatomie und Physiologie*, 1896.

34. **Hamburger.** — Das Verhalten des Blutes gegenüber Salzlösungen. Proces verbaal der k. Akad. von Wetensch. 29 déc. 1883.
35. — Wie viel Wasser kann man dem Blute zusetzen, ohne dass Hæmoglobin aus den Blutkörperchen austritt? Onders Physiol. labor. Hoogeschool 1886.
36. **Hamburger.** — Arch. für Anatomie und Physiologie 1886.
37. — Über den Einfluss chemischer Verbindungen auf Blutkörperchen im Zusammenhang mit ihren Molekulargewichten. Arch. f. Anat. und. Phys, 1887. — Onders.... 1887.
38. — Die Permeabilität der rothen Blutkörperchen im Zusammenhang mit den isotonischen Coefficienten. Zeitschr. f. Biol. 1889. Zeitschr. für physik. Chemie 1890. — Versl. in Med. der kon. Akad. v. Wetensch. 1890.
39. — Über die Regelung der Blutbestandtheile bei künstlicher hydræmischen Plethora, Hydræmie und Anhydræmie. Zeitschrift für Biologie 1890.
40. — Über den Einfluss der Athmung auf die Permeabilität der rothen Blutkörperchen. Zeitsch. f. Biol. XXVIII.
41. — Über den Einfluss von Sæure und Alkali auf defibrinirtes Blut. Arch. f. Anat. u. Physiol. 1892 — Versl..., 1892.
42. — Über den Einfluss von Sæure und Alkali auf die lebendigen Blutkörperchen. Arch. f. Anat. u. Physiol. 1892.
43. — Vergleichende Untersuchungen von arteriellen und venösen Blute und über den bedeutenden Einfluss der Art des Defibrinirens auf die Resultate von Blutañalysen. Arch. f. Anat. u. Physiol. 1893.
44. — Über den Einfluss von Sæure und Alkali auf die Permeabilität der lebendigen Blutkörperchen, nabst einer Bemerkung über die Lebensfähigkeit des defibrinirten Blutes. Du Bois Reymond's Arch. Physiol. Abth. 1893.
- 44^{bis}. — Arch. für pathol. Anat. CXL1 1897.
- 44^{ter}. — Arch. für Physiol. 1898.
45. **Hayem.** — Arch. Phys. 1879.
46. **Hedin.** — Über die Permeabilität der Blutkörperchen. Arch. für die ges. Physiol. 1897.

47. **Hermann.** — Untersuchungen über den Hæmoglobingehalt des Blutes bei vollständiger Inanition. Pflüger's Archiv. vol. XLIII, 1888.
48. **Hunter.** — Action de la toluyène-diamine, contribution à la pathologie de l'ictère. The Journal of pathol. and bact. III.
49. **Jona.** — La résistance du sang du fœtus et du nouveau-né. Riforma med. 29 et 30 août 1895.
50. **Kowaleski.** — Über die Wirkung der Salze auf die rothen Blutkörperchen. Centralb. f. d. med. Wissens. 1886.
51. **Laker.** — Wiener med. Presse 1890.
52. **Langlois.** — Soc. de biol. Nov. 1896.
53. **Lapicque.** — Mutations organiques du fer chez les Vertébrés. Thèse de doctorat ès-sciences. Paris, 1897.
54. **Lépine.** — Sur la résistance globulaire, revue mensuelle, 1880.
55. **Limbeck.** — Klinische Beobachtungen über die Resistenz der rothen Blutkörperchen. Prager med. Woch. 1890.
56. **Malassez.** — Thèse Paris 1873.
57. — Sur l'anémie saturnine, Soc. de biol. 1873.
58. — Sur la richesse des globules rouges du sang chez les cancéreux.
59. — Sur la richesse des globules du sang chez les tuberculeux, Soc. anatomique 1874.
60. — Les premières recherches sur la résistance des globules rouges du sang. Comptes rendus de la Soc. de biol. 1895.
61. — Sur les solutions salées dites physiologiques, Soc. de biol. 1896.
62. — Sur les prétendus liquides conservateurs ou fixateurs des globules rouges et les erreurs qu'ils peuvent causer dans les mensurations et évaluations de volume de ces éléments. Soc. de biol. 1896.
63. — Sur l'altérabilité des globules rouges, Soc. de biol. 1897.
64. **Manca.** — Influence de la cocaïne sur la résistance des globules rouges du sang. Arch. ital. de biol. XXIII et Lo Sperimentale XLVIII. 1895.
65. — Influence de la fatigue musculaire sur la résistance des globules rouges du sang. Arch. ital. de biologie XXIII. 1895.

66. — Intorno alla progressiva diminuzione della resistenza del sangue dopo la sua estrazione dall'organismo. Arch. ital. di Clin. med., maggio 1896.
67. **Maragliano**. — Clinica medica di Genova 1884.
68. — Academia medica di Genova 1885-1887.
69. — Lezione di chiusura, 21 giugno 1888.
70. — **Maragliano et Castellino**. — Accademia medica di Genova. 28 maggio 1890.
71. **Masoin**. — Contribution à l'étude des substances méthémoglobinisantes. Arch. de pharmacodynamie 1898.
72. **Massart**. — Sensibilité et adaptation des organismes à la concentration des solutions salines. Arch. de biol. Genève 1889.
73. **Maurel**. — Action de l'eau distillée sur les éléments figurés du sang du lapin, Soc. biol. 1896.
74. — Action du chlorure de sodium sur le sang du lapin, Soc. biol. 1897.
75. — Action du chlorure de sodium sur le sang de l'homme, Soc. biol. 1897.
76. — Conclusions générales sur l'action du chlorure de sodium, Soc. biol. 1897.
77. **Mayet**. — Sur quelques points relatifs aux injections intra-veineuses, Soc. biol. 1896.
78. — Action du chlorure de sodium sur les hématies, Soc. biol. 1897.
79. **Meunier**. — Contribution à la pathogénie de la cirrhose pigmentaire, thèse Paris 1898.
80. **Mosso**. — Résistance des globules rouges. Arch. ital. de biol. VIII 1887 et Rendiconto della R. Accademia dei Lincei, 3 aprile 1887.
81. **Murri**. — Dell' emoglobinuria da freddo. Bologna, 1879-80.
82. — Emoglobinuria e sifilide. Revista clinica 1885.
83. **Ottolenghi**. — Arch. per le Scienze mediche, vol. XVII, Gazz. med. di Torino, décembre 1893.
84. **A. Pugliese**. — Sur la présence de méthémoglobine dans le sang circulant des batraciens. Arch. ital. de biol. XXII et Accad. dei fisiocrit. di Siena VI, 1895.
85. **A. Pugliese**. — Sur l'action méthémoglobino-gène du venin de crapaud. Arch. ital. de biol. XXII. 1895.

86. **Rénault** — Soc. de Biol. 1879.
 87. **Stadelmann**. — Das Toluylendiamin und seine Wirkung auf den Thierkörper. Ein Betrag zur Lehre vom Icterus. Archiv für experimentelle Pathol. und Pharmakol., tome 14, 1881.
 88. — L'empoisonnement chronique par la toluyène-diamine. Archiv für experimentelle Pathologie, tome 23, 1887.
 89. — Weitere Beiträge zur Lehre vom Icterus. Deutsch Arch. f. Klin. medic., t. 43, 1887.
 90. — Der Icterus und seine verschiedenen Formen. Stuttgart 1891.
 91. **Vaquez et Marcano**. — Soc. de Biologie. Janvier 1896.
 92. **Vaquez**. — Recherches sur l'hématolyse in vitro. Soc. de biol. 1897.
 93. — Des méthodes propres à évaluer la résistance des globules du sang. Soc. de biol., février 1898.
 94. **Vaquez et Bousquet**. — Du titre des solutions salines employées en injections. Soc. de biologie 1899.
 95. **Vicarelli**. — Isotonia del sangue negli ultimi mesi della gravidanza, nel puerperio, nell'allattamento, Congresso medico di Siena nell'agosto 1891.
 96. **Viola**. — Gazz. degli Ospedali, gennaio 1894.
 97. — Ricerche ematologiche in un caso d'emoglobinuria parossistica. Policlinico, ottobre 1895.
 98. **Viola et Jona**. — Alterazioni del sangue dopo il salasso. Arch. per le Scienze mediche, vol. XIX.
 99. **Vivenza**. — Sulla funzione ematolitica del rene. Sperimentale, 1893.
 100. **De Vries**. — Sur la force osmotique des solutions diluées, comptes rendus Acad. des Sciences 1883.
 101. — Eine Methode zur Analyse der Turgorkraft Pringsheim's Jahr. f. Wiss. Bot. 1884.
 102. — Isotonische Coefficienten einiger Salze. Zeitschr. für physik. Chemie 1888.
 103. **Würtz**. — Dictionnaire de Chimie.
 104. **Zanier**. — Resistenza del sangue fetale. Gazz. degli Ospedali, maggio 1895.
-

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	5
HISTORIQUE.	
Chap. I ^{er} . - Action de la toluyène-diamine.	9
Chap. II. - Isotonie. Résistance globulaire. Hématolyse	27
RECHERCHES PERSONNELLES.	
Chap. III. - Moyens d'étude.	45
Chap. IV. - Résultats de nos expériences.	63
EXPÉRIENCES	73
CONCLUSIONS	113
BIBLIOGRAPHIE.	117
